

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
BIOLÓGICAS

Bianca de Oliveira Carvalho

**EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DA
TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE
ALUMÍNIO-CLORO EM MODELOS *IN VITRO* DE CÂNCER DE
MAMA TRIPLO-NEGATIVO**

JUIZ DE FORA
2025

BIANCA DE OLIVEIRA CARVALHO:

**EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DA
TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE
ALUMÍNIO-CLORO EM MODELOS *IN VITRO* DE CÂNCER DE
MAMA TRIPLO-NEGATIVO**

Dissertação de Mestrado do Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias, para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas: Área: Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias.

Orientadora: Profa. Dra. Jacy Gameiro

JUIZ DE FORA

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca
Universitária da UFJF,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Carvalho, Bianca de Oliveira.
EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DA
TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE
ALUMÍNIO-CLORO EM MODELOS IN VITRO DE CÂNCER DE
MAMA TRIPLO-NEGATIVO / Bianca de Oliveira Carvalho. --
2025.
78 p. : il.

Orientadora: Jacy Gameiro
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de
Juiz de Fora, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de
Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Imunologia e
Genética, 2025.

1. Câncer de Mama Triplo Negativo. 2. Imunologia. 3.
Ftalocianina de Alumínio Cloro. 4. Nanotecnologia. 5.
Fotosensibilizador Nanocarreado. I. Gameiro, Jacy, orient. II.
Título.

BIANCA DE OLIVEIRA CARVALHO

EFEITOS CITOTÓXICOS E ANTIPROLIFERATIVOS DA TERAPIA FOTODINÂMICA COM FTALOCIANINA DE ALUMÍNIO-CLORO EM MODELOS IN VITRO DE CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas. Área de concentração: Imunologia e doenças infecto-parasitárias.

Aprovada em 27 de agosto de 2025.

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª. Jacy Gameiro -
Orientadora Universidade
Federal de Juiz de Fora

**Profª Drª. Michele Munk
Pereira**
Universidade Federal de
Juiz de Fora

**Profª Drª. Daniela
Zimmermann**
UNESPAR

Juiz de Fora, 18/08/2025.



Documento assinado eletronicamente por **Jacy Gameiro, Professor(a)**, em 27/08/2025, às 15:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Michele Munk Pereira, Professor(a)**, em 27/08/2025, às 15:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **DANIELLE CRISTINA ZIMMERMANN FRANCO, Usuário Externo**, em 27/08/2025, às 15:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Bianca de Oliveira Carvalho, Usuário Externo**, em 27/08/2025, às 15:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf (www2.ufjf.br/SEI) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador **2559953** e o código CRC **AE0E30B1**.

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação à minha esposa, Amanda, companheira incansável, cujo amor, paciência e apoio incondicional foram fundamentais em cada etapa desta jornada acadêmica. Obrigado por acreditar em mim, mesmo nos dias em que eu duvidei.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas pela oportunidade de desenvolver este projeto. Sou imensamente grata pela bolsa concedida, que financiou meus estudos e possibilitou a concretização deste sonho.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Jacy Gameiro, minha eterna gratidão por me acolher em seu grupo, confiar em mim e apostar no meu potencial. Obrigada por cada ensinamento compartilhado, pela paciência nas dificuldades, pela escuta empática e pelo respeito inabalável com que sempre me tratou. Sua orientação foi um farol nessa caminhada.

Ao Prof. Dr. Bruno Henrique Vilsinski e ao seu aluno Matheus, agradeço pela parceria generosa, pela disponibilidade constante e pela confiança ao me permitir conduzir este projeto. Sem o comprometimento e a paciência de vocês, esta pesquisa não teria sido possível.

Aos colegas do LIDIPO — Sara, Letícia, Otto, Maju, Luiza, Thaís, Gabi, Jenny e Maria Júlia — minha gratidão por transformarem o laboratório em um espaço de leveza, acolhimento e amizade verdadeira. Cada um de vocês fez parte essencial desta jornada, com risos, conselhos, escuta e companheirismo. Carregarei vocês sempre comigo.

Ao técnico Lucas, e aos técnicos do LIP, Rogério e Bárbara, obrigado por nos socorrerem nos momentos mais caóticos e por serem parte silenciosa, mas fundamental, do avanço da ciência. Seu trabalho merece todo o reconhecimento.

Aos professores do Programa, por sua dedicação em formar não apenas cientistas, mas pessoas mais críticas, sensíveis e humanas — o impacto da formação que vocês oferecem transcende os muros da universidade.

Aos meus pais, Tida e Paulo, meus maiores exemplos de força, coragem, fé e amor incondicional. Nenhuma palavra escrita aqui será suficiente para traduzir a imensidão da minha gratidão. Obrigada por tudo o que sacrificaram, por cada gesto de apoio, por cada oração silenciosa e por sempre acreditarem em mim. Tudo o que sou é reflexo de vocês.

Às minhas irmãs, Bruna e Ana Paula, que são e sempre serão meu porto seguro. Obrigada por cada conselho, por cada risada, por cada lembrança que fortalece minha caminhada. “For you, there’s nothing in this world I wouldn’t do.”

À minha esposa e amor da minha vida, Amanda, dedico com todo o meu coração essa conquista. Você foi minha estrutura quando tudo parecia ruir — me apoiou nos dias bons e ruins, me lembrou do meu valor quando eu esqueci, enxugou minhas lágrimas e celebrou cada pequena vitória ao meu lado. Obrigada por caminhar comigo, por me amar com tanta inteireza e por me ensinar o que é o verdadeiro sentido da vida. Viver ao seu lado é, e sempre será, o meu maior prêmio. Te amo aqui e em todas as vidas que ainda virão.

Aos meus amigos, que, fisicamente ou não, estiveram perto com conselhos e palavras de incentivo nos momentos mais difíceis. Obrigada por celebrarem comigo as pequenas conquistas e por acreditarem no meu potencial. A presença de vocês fez toda a diferença nessa travessia.

A Deus, a Oxalá, ao meu pai Oxóssi, aos meus guias e ao meu anjo da guarda, agradeço por protegerem meus caminhos, por me ampararem nos momentos de desespero e por iluminarem minha jornada com força, sabedoria e fé. Nunca estive só.

E, por fim, agradeço a mim — por lutar uma guerra diária contra todos os meus temores e ainda assim, reconhecer e projetar a minha própria voz acima de tudo o que me aflige.

EPÍGRAFE

“Bom mesmo é ir à luta com determinação, abraçar a vida com paixão, perder com classe e vencer com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”.

Augusto Branco

RESUMO

O câncer de mama triplo-negativo representa um desafio terapêutico relevante devido à ausência de receptores hormonais e de HER2, o que limita as opções de tratamento disponíveis. A terapia fotodinâmica (TFD) tem se destacado como uma estratégia promissora para o tratamento de neoplasias agressivas, baseando-se na ativação de fotossensibilizadores por luz em comprimento de onda específico, promovendo a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) que induzem morte celular. Neste estudo, avaliamos os efeitos citotóxicos, antiproliferativos e antimigratórios da ftalocianina de alumínio-cloro (AICIPc) encapsulada em micelas do copolímero Pluronic® F-127 em células MDA-MB-231, um modelo in vitro de câncer de mama triplo-negativo. As células foram tratadas com diferentes concentrações da formulação AICIPc-Pluronic® F-127, seguida ou não de irradiação com luz LED (660-690 nm). A citotoxicidade foi avaliada pelos ensaios de MTT e azul de trypan; a capacidade proliferativa foi investigada por ensaio clonogênico com cristal violeta; e o comportamento migratório foi analisado por ensaios de cicatrização. As alterações morfológicas associadas à morte celular foram observadas por microscopia, e os mecanismos de morte celular foram investigados por coloração com iodeto de propídio e anexina V-FITC. Os resultados demonstraram que a formulação AICIPc-Pluronic® F-127 apresentou eficácia fotodinâmica superior em comparação à AICIPc livre, com valor de IC_{50} de 2,31 μ M após irradiação e viabilidade celular superior a 90% na ausência de luz. Concentrações mais baixas (1–2 μ M) foram mais eficazes do que concentrações mais altas, possivelmente devido à menor agregação do fotossensibilizador. Além disso, a formulação reduziu significativamente a formação de colônias e a migração celular após TFD, e induziu apoptose em concentrações mais baixas, com transição para necrose em concentrações mais elevadas. Estes achados indicam que a vetorização da AICIPc por Pluronic® F-127 potencializa seus efeitos antitumorais em células de câncer de mama triplo-negativo, representando uma abordagem nanotecnológica promissora para o desenvolvimento de terapias direcionadas, seguras e eficazes.

Palavras-chave: Pluronic® F-127; fotossensibilizador nanocarreado; MDA-MB-231; morte celular programada; nanotecnologia.

ABSTRACT

Triple-negative breast cancer represents a major therapeutic challenge due to the absence of hormone receptors and HER2 expression, resulting in limited treatment options and poor prognosis. Photodynamic therapy (PDT) has emerged as a promising strategy for treating aggressive neoplasms by activating photosensitizers with specific-wavelength light to generate reactive oxygen species (ROS) capable of inducing cell death. In this study, we evaluated the cytotoxic, antiproliferative, and antimigratory effects of aluminum-chloride phthalocyanine (AICIPc) encapsulated in Pluronic® F-127 micelles in MDA-MB-231 cells, an in vitro model of triple-negative breast cancer. Cells were treated with different concentrations of the AICIPc-Pluronic® F-127 formulation, followed or not by LED light irradiation (670 nm). Cytotoxicity was assessed by MTT and trypan blue assays; proliferative capacity was evaluated by clonogenic assay with crystal violet staining; and cell migration was analyzed using wound healing and transwell assays. Morphological changes associated with cell death were examined microscopically, and mechanisms of cell death were investigated through propidium iodide and annexin V-FITC staining. The results showed that the AICIPc-Pluronic® F-127 formulation exhibited superior photodynamic efficacy compared to free AICIPc, with an IC_{50} value of 2.31 μ M post-irradiation and cell viability above 90% in the absence of light. Lower concentrations (1–2 μ M) were more effective than intermediate or higher concentrations, likely due to reduced photosensitizer aggregation. Furthermore, the formulation significantly inhibited colony formation and cell migration following PDT, and induced apoptosis at lower concentrations, transitioning to necrosis at higher concentrations. These findings indicate that the vectorization of AICIPc with Pluronic® F-127 enhances its antitumor effects in triple-negative breast cancer cells, representing a promising nanotechnological approach for the development of safe, selective, and effective targeted therapies.

Keywords: Pluronic® F-127; nanocarrier-based photosensitizer; MDA-MB-231 cell line; programmed cell death; nanotechnology.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Subtipos moleculares de câncer de mama.....	16
FIGURA 2. O microambiente tumoral (TME) e a progressão do câncer de mama.....	18
FIGURA 3. Mecanismos de morte celular em câncer induzidos por nanopartículas....	20
FIGURA 4. Mecanismo de ação na lesão-alvo na terapia fotodinâmica (TFD).....	23
FIGURA 5. Nanoformulações com Pluronic®	28
FIGURA 6. Indução da imunidade antitumoral por na terapia fotodinâmica (PDT).....	30
FIGURA 7. Delineamento experimental.....	34
FIGURA 8. Distribuição de tamanho e índice de polidispersão por Zeta Sizer.....	41
FIGURA 9. Potencial Zeta por Zeta Sizer.....	42
FIGURA 10. Espectros de FTIR das formulações desenvolvidas.....	44
FIGURA 11. Difratoograma de raios X da formulação.....	46
FIGURA 12. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de azul de trypan.....	50
FIGURA 13. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT.....	52
FIGURA 14. Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT.....	53
FIGURA 15. Curva dose-resposta do tratamento após terapia fotodinâmica.....	54
FIGURA 16. Avaliação do efeito antiproliferativo da formulação pelo ensaio de cristal violeta.....	56
FIGURA 17. Alterações morfológicas da linhagem MDA-MB-231.....	58
FIGURA 18. Avaliação da capacidade clonogênica de células MDA-MB-231.....	58
FIGURA 19. Avaliação da capacidade clonogênica de células MDA-MB-231.....	59
FIGURA 20. Ensaio de cicatrização em células MDA-MB-231.....	61
FIGURA 21. Área cicatrizada após ensaio de cicatrização.....	62
FIGURA 22. Análise da morte celular por citometria de fluxo	64

LISTA DE QUADROS E TABELAS

TABELA 1. Comparação entre fotossensibilizadores.....	26
TABELA 2. Grupos de tratamentos experimentais.....	36

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl ₃	Ftalocianina de Alumínio Cloro
ANOVA	Análise de Variância (Analysis of Variance)
ATP	Trifosfato de Adenosina
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
BL1	Basal-like 1
BL2	Basal-like 2
BRCA1	Breast Cancer Gene 1
BRCA2	Breast Cancer Gene 2
C+	Controle Positivo
C-	Controle Negativo
CAFs	Fibroblastos Associados ao Tumor (Cancer-Associated Fibroblasts)
CDK4/6	Quinases Dependentes de Ciclina 4/6 (Cyclin-Dependent Kinases 4/6)
CMC	Concentração Micelar Crítica
CMT	Temperatura Micelar Crítica
CO ₂	Dióxido de Carbono
CTLs	Linfócitos T Citotóxicos (Cytotoxic T Lymphocytes)
CXCL12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos (Damage-Associated Molecular Patterns)
DLS	Espalhamento Dinâmico de Luz (Dynamic Light Scattering)
DMEM	Meio Eagle Modificado por Dulbecco (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
D.O.	Densidade Óptica
DRX	Difração de Raios X
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EFC	Eficiência de Formação de Colônias
EMT	Transição Epitelial-Mesenquimal (Epithelial-Mesenchymal Transition)
EO	Óxido de Etileno
EPR	Permeabilidade e Retenção Aumentadas (Enhanced Permeability and Retention)
ER	Receptor de Estrogênio (Estrogen Receptor)
ERO	Espécies Reativas de Oxigênio
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína (Fluorescein Isothiocyanate)
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (Fourier Transform Infrared Spectroscopy)
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
HER2	Receptor 2 do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2)
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
LAR	Luminal Receptor de Androgênio
LED	Diodo Emissor de Luz (Light-Emitting Diode)
LIP-UFJF	Laboratório Integrado de Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora
M	Mesenquimal
MDR	Resistência a Múltiplas Drogas (Multi-Drug Resistance)
MMPs	Metaloproteinases da Matrix (Matrix Metalloproteinases)
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
NA	Não Aplicável
NK	Natural Killer
ns	Não Significativo
O ₂	Ânion Superóxido
OH•	Radical Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde

PARP	Poli(ADP-ribose) Polimerase
PBS	Tampão Fosfato-Salino (Phosphate-Buffered Saline)
PD-1	Morte Celular Programada 1 (Programmed Cell Death 1)
PDI	Índice de Poldispersão (Polydispersity Index)
PD-L1	Ligante 1 da Morte Celular Programada (Programmed Death-Ligand 1)
PDT	Terapia Fotodinâmica (Photodynamic Therapy)
PEO	Polioxietileno
P-gp	Glicoproteína-P
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Iodeto de Propídio (Propidium Iodide)
PPO	Polioxipropileno
PR	Receptor de Progesterona (Progesterone Receptor)
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio (Reactive Oxygen Species)
rpm	Rotações por Minuto
SFB	Soro Fetal Bovino
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFT	Terapia Fototérmica
TGF- β	Fator de Crescimento Transformador beta (Transforming Growth Factor beta)
TME	Microambiente Tumoral (Tumor Microenvironment)
TNBC	Câncer de Mama Triplo-Negativo (Triple-Negative Breast Cancer)
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa (Tumor Necrosis Factor alpha)
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular (Vascular Endothelial Growth Factor)
WHO	Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)
$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Microambiente Tumoral e Resistência Terapêutica	18
1.2 Limitações Terapêuticas Atuais e Perspectivas	19
1.3 Nanotecnologia na Pesquisa do Câncer de Mama	19
1.4 Terapia Fotodinâmica (TFD)	22
1.4.1 Mecanismos de Ação da TFD: Morte Celular e Modulação do Microambiente Tumoral.....	23
1.5 Ftalocianina de Alumínio Cloro (AICIPc)	26
1.6 Pluronic® F-127- Sistema de Entrega de Fármacos	27
1.7 Importância da Pesquisa para o Câncer de Mama	29
2 OBJETIVOS	32
2.1 Objetivo geral	32
2.2 Objetivos específicos	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 Reagentes, equipamentos utilizados e linhagem celular	33
3.2 Delineamento experimental	33
3.3 Caracterização físico-química	34
3.4 Estudos in vitro	35
3.4.1 Cultura celular.....	35
3.4.2 Irradiação para Terapia Fotodinâmica.....	35
3.4.3 Ensaio de Exclusão por Azul de Trypan.....	35
3.4.4 Avaliação da Viabilidade Celular.....	36
3.4.5 Ensaio de atividade mitocondrial (MTT).....	37
3.4.6 Ensaio Clonogênico.....	38
3.4.7 Ensaio de Cicatrização (wound healing).....	39
3.4.8 Ensaio de Apoptose.....	39
3.4.9 Análise estatística.....	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	41
4.1 Caracterização Físico-química da AICIPc-Pluronic® F-127	41
4.1.1 Distribuição de Tamanho e Índice de Polidispersão (PDI).....	41

4.1.2	Potencial Zeta e Estabilidade Coloidal.....	42
4.1.3	Correlação entre Tamanho e Potencial Zeta.....	43
4.1.4	Análise Espectroscópica por FTIR.....	43
4.1.5	Difração de Raios X (DRX).....	46
4.1.6	Estabilidade Coloidal e Implicações.....	47
4.2	Estudos in vitro em células MDA-MB-231.....	49
4.2.1	Fototoxicidade e Citotoxicidade no Escuro.....	49
4.2.1.1	Ensaio de Azul de Trypan.....	49
4.2.1.2	Ensaio de Atividade Mitocondrial (MTT).....	51
4.2.1.3	Análise Dose-Resposta e Determinação do IC ₅₀	52
4.2.1.4	Ensaio de Cristal Violeta.....	55
4.2.3	Morfologia Celular.....	57
4.2.4	Efeitos na Capacidade Clonogênica.....	58
4.2.5	Efeitos na migração e invasão celular.....	61
4.2.6	Avaliação do tipo de morte celular.....	63
5	CONCLUSÃO.....	66
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa um problema de saúde pública mundial, sendo o tipo de câncer mais comum entre mulheres, com exceção do câncer de pele não melanoma. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS), estima-se que a cada ano surjam cerca de 2,3 milhões de novos casos de câncer de mama em todo o mundo, fazendo com que 95% dos países apresentem o câncer de mama como o primeiro ou o segundo maior responsável pela causa de morte entre as mulheres (Cardoso, 2022; WHO, 2023). Apesar dos avanços no diagnóstico precoce e nas abordagens terapêuticas, o câncer de mama continua sendo a principal causa de morte por câncer na população feminina (Sung *et al.*, 2021; Nolan *et al.*, 2023).

A epidemiologia do câncer de mama revela uma doença multifatorial, cujos fatores de risco incluem predisposição genética, menarca precoce, menopausa tardia, exposição excessiva ao estrogênio endógeno ou exógeno, radiação, baixa paridade, alta densidade mamária e histórico de hiperplasia atípica. Destaca-se também a importância das mutações genéticas BRCA-1/BRCA-2, genes que produzem proteínas reparadoras de DNA danificado, atuando na supressão de tumores (Chabner, 2015; Cohen *et al.*, 2023). Ademais, o estilo de vida contemporâneo tem contribuído como fator agravante, com o aumento do consumo de álcool e dos índices de obesidade na população (Cardoso, 2022; Oliveira *et al.*, 2023).

Além disso, longe de ser uma doença homogênea, o câncer de mama engloba um grupo diverso de neoplasias com características biológicas e moleculares distintas, apresentando diferentes manifestações clínicas, respostas terapêuticas e prognósticos (Harbeck *et al.*, 2019; Jiang, 2023). A classificação molecular, baseada em perfis de expressão gênica, identifica principalmente quatro subtipos intrínsecos: luminal A, luminal B, HER2-enriquecido e basal-like (Perou *et al.*, 2000; Silva, *et al.*, 2019). Essa classificação é essencial para a definição do prognóstico e a escolha do tratamento, sendo amplamente utilizada em oncologia clínica (Figura 1). Os subtipos mais estudados são:

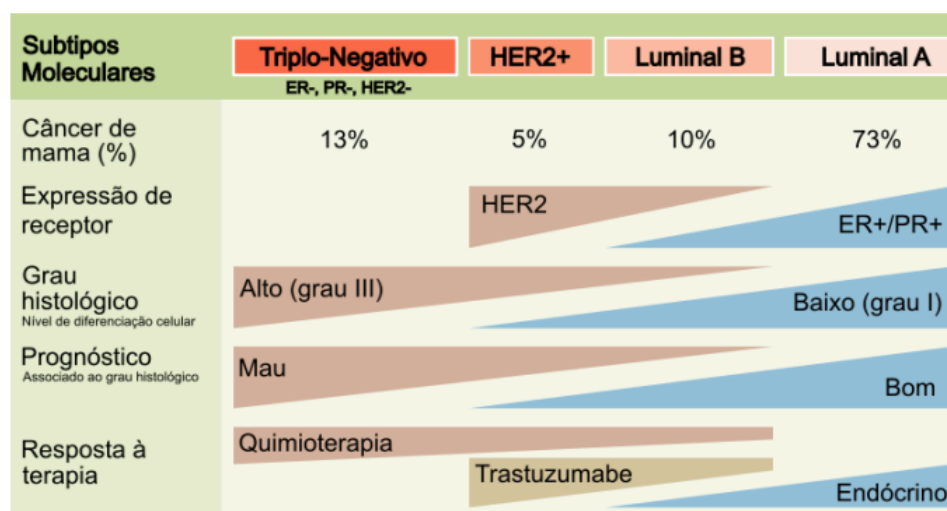


Figura 1 - Subtipos moleculares de câncer de mama. A primeira linha (%) refere-se à incidência dos subtipos moleculares de câncer de mama no mundo. A segunda linha refere-se à expressão dos receptores em cada subtipo molecular. A terceira linha ao grau histológico ou nível de diferenciação celular). A quarta linha refere-se ao prognóstico de cada subtipo molecular diretamente associado ao grau histológico. Enquanto a quinta e última linha refere-se à terapia usualmente utilizada em cada subtipo molecular. Fonte: Adaptado de WONG (2012).

- **Luminal A:** Esse subtipo, que representa cerca de 73% dos casos, é caracterizado pela expressão de receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR), além de uma baixa expressão do marcador de proliferação Ki-67 (<20%) (Harbeck, *et al.*, 2019; Waks & Winer, 2019). Este apresenta um comportamento biológico menos agressivo e, geralmente, responde bem à terapia hormonal. O prognóstico para pacientes com tumores luminais A é considerado favorável, embora a resistência adquirida à terapia endócrina, como tamoxifeno e inibidores de aromatase, ainda seja um desafio (Goldhirsch *et al.*, 2013).
- **Luminal B:** Esse subtipo apresenta receptores hormonais positivos, mas com maior expressão de Ki-67 ou amplificação do gene HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) (Harbeck, *et al.*, 2019; Waks & Winer, 2019). Este é mais agressivo do que o luminal A e frequentemente requer combinações de terapias, incluindo quimioterapia e terapia hormonal. Estratégias mais recentes, como o uso de inibidores de CDK4/6 (palbociclibe, ribociclibe), têm mostrado promessas em melhorar o controle da doença, especialmente em estágios avançados (Goldhirsch *et al.*, 2013).
- **HER2-enriquecido:** Esse subtipo é caracterizado pela superexpressão da proteína HER2 e pela ausência de receptores hormonais. Antes do advento das

terapias-alvo, como trastuzumabe e pertuzumabe, o prognóstico para esse subtipo era reservado (Harbeck, *et al.*, 2019; Waks & Winer, 2019). Atualmente, avanços em terapias baseadas em anticorpos monoclonais e conjugados de anticorpos, como o trastuzumabe-emtansina, têm transformado o manejo clínico, embora a heterogeneidade tumoral e a resistência ao tratamento ainda sejam obstáculos importantes (Goldhirsch *et al.*, 2013; Harbeck, *et al.*, 2019).

- **Triplo-negativo:** Representando aproximadamente 13% dos casos, o subtipo triplo-negativo não expressa receptores hormonais nem HER2, o que limita as opções terapêuticas a protocolos de quimioterapia padrão (Harbeck, *et al.*, 2019; Waks & Winer, 2019). Este é associado a um comportamento biológico agressivo, maior probabilidade de metástase precoce e menor taxa de sobrevivência em longo prazo. Recentemente, a imunoterapia com inibidores de checkpoint imunológico (anti-PD-1/PD-L1) e estratégias inovadoras, como nanotecnologia e terapia gênica, têm sido exploradas para melhorar o tratamento desse subtipo (Goldhirsch *et al.*, 2013; Harbeck *et al.*, 2019; Filho *et al.*, 2023; Gao, *et al.*, 2023).

O câncer de mama triplo-negativo (TNBC, do inglês Triple-Negative Breast Cancer) representa o subtipo mais desafiador clinicamente. Caracterizado pela ausência dos três receptores (ER, PR e HER2), representa aproximadamente 13-20% de todos os casos de câncer de mama e está associado a prognóstico desfavorável, alto risco de metástase e recorrência precoce (Foulkes *et al.*, 2010; Garrido-Castro *et al.*, 2019).

Este subtipo apresenta características clínicas e moleculares distintas, incluindo maior incidência em mulheres jovens, afrodescendentes e portadoras de mutações nos genes BRCA1/2, além de comportamento biológico agressivo com alto potencial metastático (Garrido-Castro *et al.*, 2019; Silva, *et al.*, 2019; Nolan *et al.*, 2023). Adicionalmente, o TNBC apresenta significativa heterogeneidade molecular, com pelo menos quatro subtipos distintos identificados: basal-like 1 (BL1), basal-like 2 (BL2), mesenquimal (M) e luminal receptor de androgênio (LAR) (Lehmann *et al.*, 2016). Essa heterogeneidade molecular contribui para a variabilidade na resposta terapêutica e no prognóstico clínico observado em pacientes com TNBC.

1.1 Microambiente Tumoral e Resistência Terapêutica

A complexidade do câncer de mama estende-se além da heterogeneidade intratumoral, englobando as interações dinâmicas entre as células tumorais e o microambiente tumoral (TME). Este microambiente inclui fibroblastos associados ao tumor (CAFs), células imunes infiltrantes e a matriz extracelular (Figura 2), componentes que contribuem para a progressão tumoral, evasão imunológica e resistência terapêutica, representando alvos potenciais para novas intervenções terapêuticas (Oualla *et al.*, 2017; Silva *et al.*, 2019; Cardoso, 2022; Khan, 2022).

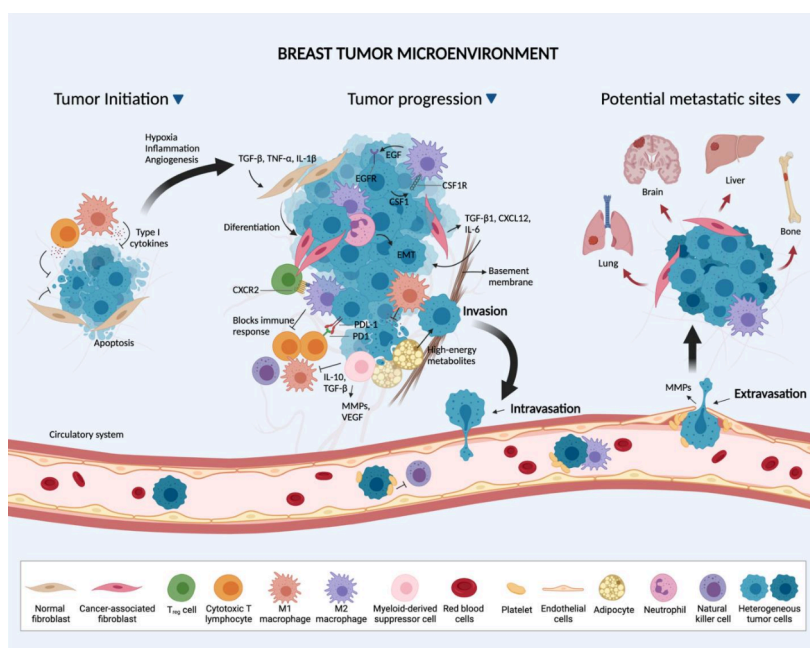


Figura 2 - O microambiente tumoral (TME) e a progressão do câncer de mama. No início da iniciação tumoral, o tumor em desenvolvimento é exposto a sinais supressores de crescimento provenientes do processo inflamatório. As citocinas (TGF- β , IL-1 β e TNF- α) liberadas do processo inflamatório modulam a diferenciação de fibroblastos normais em fibroblastos associados ao câncer (CAFs). Estes, por sua vez, secretam proteínas da matriz extracelular e fatores solúveis (TGF- β , CXCL12, IL-6) que estimulam a transição epitelial-mesenquimal (EMT), o crescimento e a progressão do tumor. Os neutrófilos podem induzir EMT e promover a progressão tumoral através da liberação de citocinas. Os adipócitos secretam metabólitos de alta energia para alimentar o crescimento tumoral. Os macrófagos associados ao tumor (principalmente macrófagos M2) apoiam vários processos dentro do TME, incluindo o crescimento e a invasão do BC, secretando citocinas e fatores de crescimento pró-tumorigênicos. Esses eventos orquestrados no tumor primário permitem que as células tumorais adquiram um fenótipo móvel e invasivo. Fatores secretados (MMPs, VEGF) facilitam ainda mais a intravasação das células tumorais na circulação. O local preferido de metástase pode ser influenciado pelo subtipo do câncer de mama. Fonte: Terceiro, L. E. *et al.* The Breast Tumor Microenvironment: A Key Player in Metastatic Spread. *Cancer*, 13, 19, p.4798, 2021.

O desenvolvimento de resistência aos tratamentos constitui outro aspecto crítico no manejo do câncer de mama. Mecanismos como alterações epigenéticas, plasticidade celular e ativação de vias de sinalização alternativas são frequentemente implicados na falha terapêutica (Khan, 2022). Para o TNBC especificamente, a

resistência ao tratamento é um fenômeno complexo que pode ocorrer devido a alterações genéticas nas células tumorais, microambiente tumoral hostil e a presença de células-tronco tumorais que podem não ser afetadas pela quimioterapia convencional (Oualla *et al.*, 2017; Wang & Wu, 2023).

1.2 Limitações Terapêuticas Atuais e Perspectivas

A ausência de alvos moleculares específicos para o TNBC limita significativamente as opções terapêuticas, sendo a quimioterapia convencional a principal abordagem utilizada (Wang & Wu, 2023). Esta limitação resulta em taxas de recorrência significativamente mais altas quando comparadas com outros subtipos, resistência aos quimioterápicos e alta toxicidade sistêmica, representando desafios significativos no tratamento desse subtipo agressivo (Bianchini *et al.*, 2016; Dent *et al.*, 2007).

Recentemente, novas abordagens terapêuticas têm sido desenvolvidas para o TNBC, incluindo inibidores de PARP para pacientes com mutações em BRCA1/2, imunoterapia com inibidores de checkpoint para tumores PD-L1 positivos e terapias-alvo para subpopulações específicas de TNBC (Debien *et al.*, 2023; Filho *et al.*, 2023). Entretanto, essas terapias beneficiam apenas subgrupos específicos de pacientes, e a resistência aos tratamentos continua sendo um desafio significativo (Waks & Winer, 2019; Wang & Wu, 2023).

Nesse contexto, estudos recentes em biologia molecular têm focado na identificação de biomarcadores prognósticos e preditivos, além do desenvolvimento de terapias direcionadas que possam superar os mecanismos adaptativos de resistência (Silva *et al.*, 2019; Cardoso, 2022; Nolan *et al.*, 2023). A busca por novas estratégias terapêuticas mais eficazes e seletivas torna-se essencial para melhorar o prognóstico e a qualidade de vida das pacientes, representando a abordagem nanotecnológica uma estratégia promissora para alcançar melhores resultados clínicos em pacientes com TNBC.

1.3 A Nanotecnologia na Pesquisa do Câncer de Mama

Diante das limitações terapêuticas apresentadas, especialmente no tratamento do câncer de mama triplo-negativo, a nanotecnologia emerge como uma abordagem promissora capaz de revolucionar tanto o diagnóstico quanto o tratamento dessa neoplasia. As estratégias nanotecnológicas oferecem soluções inovadoras para os principais desafios enfrentados na oncologia mamária, proporcionando benefícios que se estendem desde a melhoria da farmacocinética dos medicamentos até o desenvolvimento de terapias mais personalizadas e eficazes (Dang & Guan, 2020; Azizi *et al.*, 2023) (Figura 3).

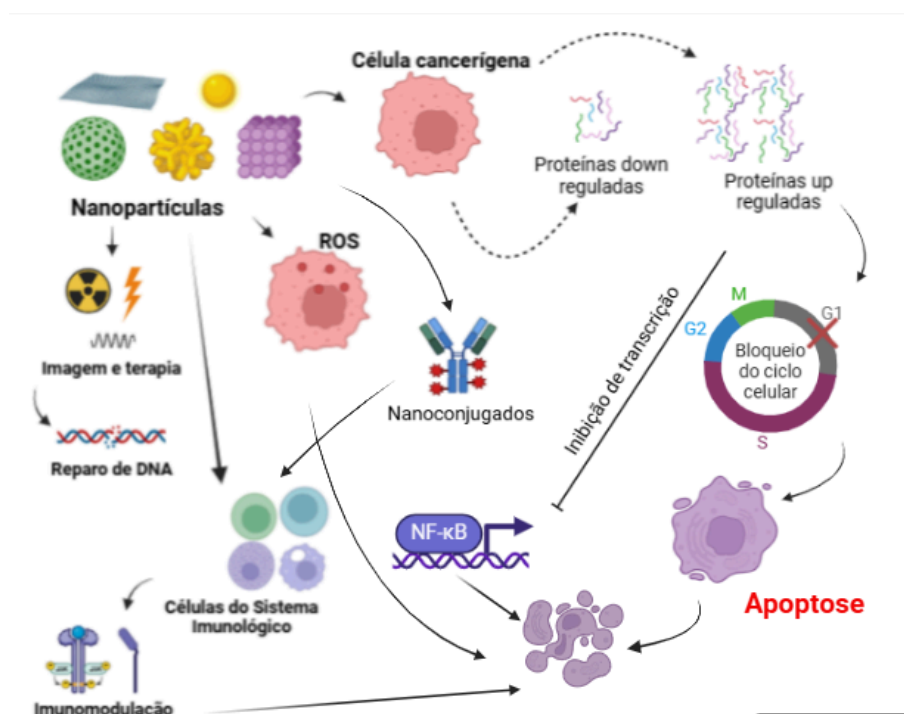


Figura 3 - Mecanismos de morte celular em câncer induzidos por nanopartículas. Fonte: Adaptado de Mundekkad e Cho (2022). Recursos de Biorender.com.

Uma das principais vantagens da nanotecnologia reside na capacidade de criar sistemas de entrega direcionada de fármacos. Através da modificação superficial de nanopartículas para reconhecer marcadores específicos presentes nas células cancerosas, é possível direcionar terapias especificamente para o tecido tumoral, minimizando significativamente os efeitos colaterais em tecidos saudáveis (Yao *et al.*, 2020; Azizi *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2023; Elumalai *et al.*, 2024). Esta abordagem direcionada representa um avanço fundamental em relação às terapias convencionais, que frequentemente afetam indiscriminadamente células saudáveis e tumorais.

Complementarmente, a nanotecnologia aborda desafios farmacológicos fundamentais, como a baixa solubilidade em água de muitos agentes quimioterápicos hidrofóbicos. Através do encapsulamento em sistemas nanoestruturados, esses fármacos podem ser administrados em doses mais baixas com maior biodisponibilidade, resultando em aumento significativo da eficácia terapêutica (Azizi *et al.*, 2023; Xu *et al.*, 2023; Elumalai *et al.*, 2024). Adicionalmente, os sistemas de nanopartículas permitem a liberação controlada de medicamentos, prolongando o tempo de circulação no sangue e otimizando a farmacocinética, o que pode resultar em maior eficácia terapêutica com menor frequência de administração (Azizi *et al.*, 2023; Abbas *et al.*, 2025).

No contexto diagnóstico, as nanopartículas funcionam como agentes de contraste avançados em técnicas de imagem molecular, melhorando substancialmente a detecção precoce do câncer de mama. A capacidade de visualizar células tumorais em tempo real não apenas facilita o diagnóstico, mas também permite a avaliação contínua da resposta ao tratamento, contribuindo para a personalização das terapias (Azizi *et al.*, 2023; Abbas *et al.*, 2025).

Uma característica particularmente relevante da nanotecnologia é sua versatilidade para desenvolver terapias combinatórias. A possibilidade de incorporar múltiplas modalidades terapêuticas em uma única nanopartícula permite a administração simultânea de quimioterapia, terapia fotodinâmica e agentes imunológicos. Esta abordagem multifacetada aumenta significativamente a eficácia do tratamento ao atacar as células tumorais através de diferentes mecanismos, reduzindo simultaneamente a probabilidade de desenvolvimento de resistência (Azizi *et al.*, 2023; Chen *et al.*, 2023; Elumalai *et al.*, 2024).

A questão da resistência a múltiplas drogas (MDR), um desafio significativo especialmente no TNBC, pode ser efetivamente abordada através de estratégias nanotecnológicas. O encapsulamento de fármacos em nanopartículas capazes de inibir a atividade de proteínas de efluxo, como a glicoproteína-P, permite aumentar a concentração intracelular do fármaco, superando assim os mecanismos de resistência celular (Abbas *et al.*, 2025).

No âmbito da imunoterapia, a nanotecnologia oferece ferramentas sofisticadas para o desenvolvimento de vacinas e terapias imunológicas. Nanopartículas podem ser projetadas para apresentar antígenos tumorais de forma otimizada, potencializando a ativação de células T e a resposta imune antitumoral (Chen *et al.*, 2023; Abbas *et al.*,

2025). Esta capacidade de modular a resposta imunológica representa uma estratégia particularmente promissora para o tratamento do TNBC, considerando a crescente evidência do papel da imunidade na progressão desta neoplasia.

Finalmente, a nanotecnologia acelera significativamente os processos de pesquisa e desenvolvimento de novos tratamentos. As técnicas nanotecnológicas permitem a realização de testes em larga escala de novas combinações de fármacos e terapias, facilitando a identificação de abordagens mais eficazes e a descoberta de estratégias terapêuticas inovadoras (Mandal *et al.*, 2021; Azizi *et al.*, 2023). Esta capacidade de acelerar a translação de descobertas laboratoriais para aplicações clínicas representa um potencial transformador para o futuro do tratamento do câncer de mama.

Dessa forma, a nanotecnologia se posiciona como uma plataforma tecnológica integrada, capaz de abordar simultaneamente múltiplos aspectos da complexidade do câncer de mama, oferecendo perspectivas promissoras para superar as limitações terapêuticas atuais e melhorar significativamente o prognóstico e a qualidade de vida das pacientes.

1.4 Terapia Fotodinâmica (TFD)

A terapia fotodinâmica (TFD) emerge como uma abordagem terapêutica minimamente invasiva e promissora para o tratamento de neoplasias, baseando-se na ativação de compostos fotossensibilizadores por luz em comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular (Gurcan *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2023).

Após a administração, o fotossensibilizador acumula-se preferencialmente em células tumorais devido a características específicas do microambiente tumoral, como pH ácido, aumento da permeabilidade vascular e drenagem linfática comprometida (Castano *et al.*, 2004) (Figura 4). A subsequente irradiação com luz em comprimento de onda correspondente ao pico de absorção do fotossensibilizador promove sua excitação do estado fundamental para o estado singlete excitado. O fotossensibilizador no estado singlete excitado pode retornar ao estado fundamental, emitindo fluorescência, ou sofrer conversão intersistema para o estado triplete excitado de maior tempo de vida (Agostinis *et al.*, 2011).

No estado triplete excitado, o fotossensibilizador pode participar de dois tipos de reações fotoquímicas: reações do tipo I, envolvendo transferência de elétrons ou

hidrogênio para biomoléculas ou oxigênio molecular, gerando radicais livres e ERO como ânion superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila ($OH\bullet$); e reações do tipo II, predominantes na TFD, caracterizadas pela transferência de energia do fotossensibilizador no estado triplete excitado para o oxigênio molecular no estado triplete fundamental, gerando oxigênio singlete (1O_2), uma espécie altamente reativa (Kwiatkowski *et al.*, 2018; Gurcan *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2023).

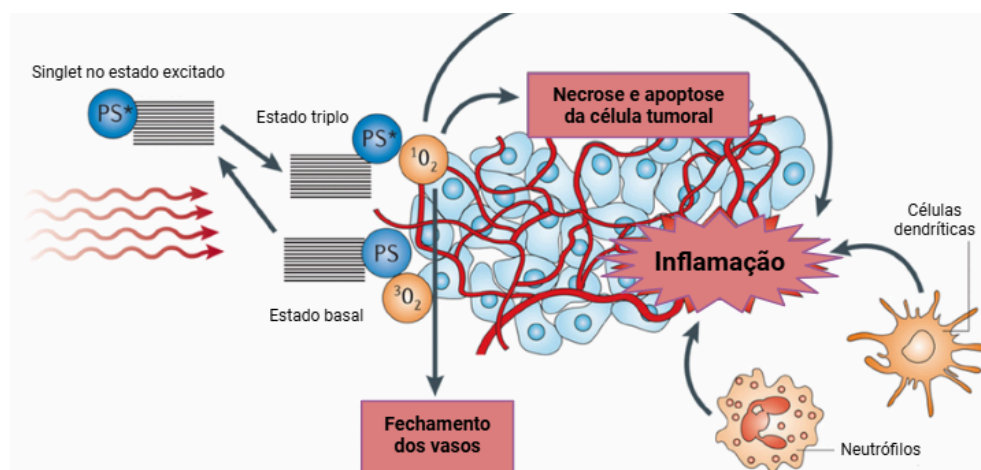


Figura 4 - Mecanismo de ação na lesão-alvo na terapia fotodinâmica (TFD). Existem dois tipos de reações durante a TFD. Após a absorção da luz, um fotossensibilizador é transformado do estado fundamental para um estado excitado. O sensibilizador ativado gera radicais (reação tipo I) ou substratos oxidativos (reação tipo II) para danificar a célula. Fonte: Adaptado de Castano e colaboradores (2006). Recursos de Biorender.com.

As ERO geradas durante a TFD, especialmente o oxigênio singlete, promovem danos oxidativos a biomoléculas essenciais, incluindo lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em alterações na permeabilidade da membrana plasmática, inativação de enzimas, disfunção mitocondrial, estresse do retículo endoplasmático e danos ao DNA (Kwiatkowski *et al.*, 2018). Dependendo da localização subcelular do fotossensibilizador, intensidade da irradiação e susceptibilidade celular, diferentes mecanismos de morte celular podem ser ativados, incluindo apoptose, necrose, autofagia e morte celular imunogênica (De Silva *et al.*, 2020).

1.4.1 Mecanismos de Ação da TFD: Morte Celular e Modulação do Microambiente Tumoral

A terapia fotodinâmica demonstra sua versatilidade terapêutica através da capacidade de induzir diferentes vias de morte celular, cuja ativação depende fundamentalmente da intensidade do dano oxidativo e das características específicas do microambiente celular. Esta diversidade de mecanismos citotóxicos contribui significativamente para a eficácia terapêutica da TFD, uma vez que permite superar potenciais resistências celulares através de múltiplas vias de eliminação tumoral (De Silva *et al.*, 2020).

Em condições de dano oxidativo moderado, a geração controlada de espécies reativas de oxigênio desencadeia preferencialmente a ativação de vias apoptóticas, tanto intrínsecas quanto extrínsecas. Este processo envolve a liberação de citocromo c pelas mitocôndrias e a subsequente ativação de caspases, resultando em morte celular programada de forma ordenada e controlada (Dolmans *et al.*, 2003; Agostinis *et al.*, 2011). Por outro lado, quando o dano oxidativo atinge intensidades elevadas, observa-se a indução de morte necrótica, caracterizada pela ruptura das membranas celulares, perda da integridade do citoesqueleto e morte celular descontrolada, com consequente liberação de conteúdo intracelular inflamatório. Adicionalmente, a TFD pode induzir autofagia como mecanismo inicialmente protetor, embora, em doses específicas, este processo também contribua para a morte celular programada, demonstrando a complexidade e versatilidade dos mecanismos citotóxicos envolvidos (De Silva *et al.*, 2020).

Além dos efeitos citotóxicos diretos, a terapia fotodinâmica exerce influência significativa sobre o microambiente tumoral, modulando diversos componentes que contribuem para a progressão neoplásica. Um dos principais efeitos observados é a inibição da angiogênese através do dano às células endoteliais, resultando na redução do suprimento de nutrientes e oxigênio para o tumor, comprometendo assim seu crescimento e viabilidade. Esta ação antiangiogênica representa um mecanismo complementar importante para o controle tumoral, especialmente considerando a dependência dos tumores sólidos de uma vascularização adequada para seu desenvolvimento (Agostinis *et al.*, 2011; De Silva *et al.*, 2020).

Paralelamente, a TFD promove alterações profundas no microambiente imunológico tumoral. A morte celular induzida pela terapia resulta na liberação de antígenos tumorais e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), que funcionam como sinais de perigo capazes de ativar tanto respostas imunes inatas quanto adaptativas. Esta ativação imunológica recruta células efetoras, incluindo

células dendríticas e linfócitos T citotóxicos, promovendo uma resposta antitumoral sistêmica que pode estender os benefícios terapêuticos além do sítio de aplicação da TFD. Este efeito imunestimulador representa uma vantagem particular da terapia fotodinâmica, diferenciando-a de outras modalidades terapêuticas que frequentemente exercem efeitos imunossupressores (Agostinis *et al.*, 2011).

A modulação dos fibroblastos associados ao tumor (CAFs) constitui outro aspecto relevante da ação da TFD sobre o microambiente tumoral. Considerando que os CAFs geralmente promovem a progressão tumoral através da secreção de fatores de crescimento, citocinas pró-inflamatórias e componentes da matriz extracelular que facilitam a invasão e metástase, sua inativação ou eliminação pela TFD contribui significativamente para a redução da resistência ao tratamento. Esta capacidade de modular os elementos estromais que suportam o crescimento tumoral amplifica os efeitos terapêuticos da TFD, criando um ambiente menos favorável à sobrevivência e proliferação das células neoplásicas (Agostinis *et al.*, 2011; Gurcan *et al.*, 2021).

Dessa forma, a terapia fotodinâmica atua através de um mecanismo multifacetado que combina citotoxicidade direta através de múltiplas vias de morte celular com efeitos moduladores sobre o microambiente tumoral, incluindo inibição angiogênica, ativação imunológica e neutralização de elementos estromais pró-tumorais. Esta abordagem integrada representa uma vantagem terapêutica significativa, especialmente no contexto do tratamento de neoplasias complexas como o câncer de mama triplo-negativo.

Além dos efeitos citotóxicos diretos sobre as células tumorais, a TFD também promove efeitos vasculares, resultando em trombose, hemorragia e isquemia no tecido tumoral, e efeitos imunológicos, incluindo ativação de resposta inflamatória aguda e indução de imunidade antitumoral específica (Gurcan *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2023; Souza, 2024). Este efeito multifatorial da TFD contribui para sua eficácia terapêutica.

Atualmente, a TFD é aprovada para tratamento de diversos tipos de câncer, incluindo câncer de pele não-melanoma, câncer de esôfago, câncer de pulmão não-pequenas células em estágio inicial e câncer de bexiga superficial (Dolmans *et al.*, 2003). Além de apresentar vantagens significativas sobre terapias convencionais, incluindo especificidade seletiva, baixa toxicidade sistêmica, possibilidade de aplicação repetida sem risco de resistência cruzada, capacidade de preservação do tecido normal adjacente e potencial para indução de resposta imune antitumoral (Agostinis *et al.*, 2011).

No entanto, a sua eficácia depende de múltiplos fatores, incluindo propriedades do fotossensibilizador (seletividade tumoral, localização subcelular, rendimento quântico de formação de oxigênio singlete), parâmetros de irradiação (comprimento de onda, fluência, taxa de fluência) e condições teciduais (oxigenação, pH) (Kwiatkowski *et al.*, 2018; Gurcan *et al.*, 2021; Jin *et al.*, 2023). A otimização destes parâmetros é essencial para maximizar a eficácia terapêutica da TFD em diferentes tipos de câncer.

1.5 Ftalocianina de Alumínio Cloro (AICIPc)

Entre os fotossensibilizadores de segunda geração, a ftalocianina de alumínio cloro (AICIPc) destaca-se por suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas favoráveis, incluindo alta absorção na região do vermelho do espectro visível (670-675 nm), onde há maior penetração tecidual da luz, e elevado rendimento quântico de formação de oxigênio singlete (Josefsen & Boyle, 2008; Longo *et al.*, 2009) (Tabela 1). No entanto, a natureza hidrofóbica da AICIPc limita sua aplicação clínica, devido à baixa solubilidade em meio aquoso e tendência à agregação, fatores que comprometem sua eficácia fotossensibilizadora (Muehlmann *et al.*, 2015; Longo *et al.*, 2015).

A localização subcelular da AICIPc é predominantemente lisossomal, mas também pode acumular-se na mitocôndria e retículo endoplasmático, dependendo das características físico-químicas, concentração e sistema de entrega utilizado (Pallavi *et al.*, 2022). Esta distribuição subcelular influencia os mecanismos de morte celular induzidos após fotoativação, sendo a apoptose o mecanismo predominante na TFD mediada por AICIPc (Castano *et al.*, 2006).

Tabela 1 - Comparação entre fotossensibilizadores.

Abreviações: NA, não aplicável; TFD, terapia fotodinâmica; TFT, terapia fototérmica.

	Avanços	Pico de absorção (nm)	Direcionamento	Ação	Estrutura	Significância clínica	Limitações
1ª geração	NA	630	Passivo	Apoptose	Mistura oligomérica	TFD estabelecida como terapia contra o câncer	Baixa penetração da luz, fotossensibilidade cutânea, baixa seletividade tecidual, baixa fotoestabilidade
2ª geração	Absorção em comprimentos de onda mais	630-750	Passivo	Apoptose e necrose por dano	Monomérica	Expansão da TFD para uma variedade maior	Insolubilidade, direcionamento inadequado,

	profundos, maior geração de ¹ O.			vascular		de tipos de câncer	regressão tumoral incompleta
3 ^a geração	Direcionamento ativo, plataforma multimodal de nanodelivery, propriedades ópticas avançadas	>700	Ativo	Combinada com TFD, TFT e quimioterapia	Conjugado com moléculas de direcionamento	Estabelecimento da TFD como principal terapia anticâncer	Biocompatibilidade, destruição por agregação, dados clínicos inadequados

Fonte: Adaptado de Braodwater e colaboradores (2021).

Estudos *in vitro* e *in vivo* demonstraram o potencial antitumoral da AICIPc em diversos tipos de câncer, incluindo câncer de mama (Muehlmann *et al.*, 2015), câncer cervical (Longo *et al.*, 2015), melanoma (Cangussu *et al.*, 2022) e câncer de próstata (Dang & Guan, 2020). No contexto do câncer de mama, foi demonstrado que a AICIPc apresenta efeito citotóxico seletivo sobre células tumorais em comparação com células mamárias normais após fotoativação (Goto *et al.*, 2017).

Apesar de suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas favoráveis, a natureza hidrofóbica da AICIPc limita sua aplicação clínica devido à baixa solubilidade em meio aquoso, tendência à agregação e reduzida biodisponibilidade (Muehlmann *et al.*, 2015; Longo *et al.*, 2009). A agregação do fotossensibilizador compromete sua eficácia fotossensibilizadora por reduzir o rendimento quântico de formação de oxigênio singlete, diminuir o tempo de vida do estado triplete e alterar o espectro de absorção (Mansoori, 2019).

Para superar essas limitações, diversos sistemas de entrega têm sido desenvolvidos para a AICIPc, incluindo lipossomas (Miretti *et al.*, 2021), nanopartículas poliméricas (Muehlmann *et al.*, 2015; Longo *et al.*, 2015), nanopartículas lipídicas sólidas (Samanthula, 2024) e micelas poliméricas (Pallavi *et al.*, 2022). Estes sistemas não apenas melhoram a solubilidade aquosa e reduzem a agregação da AICIPc, mas também podem aumentar sua seletividade tumoral, melhorar sua farmacocinética e potencializar sua eficácia terapêutica (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

1.6 Pluronic® F-127 como Sistema de Entrega de Fármacos

Os copolímeros em bloco da família Pluronic, também conhecidos como poloxameros, são copolímeros triblocos anfifílicos não-iônicos compostos por blocos centrais hidrofóbicos de polioxipropileno (PPO) flanqueados por blocos hidrofílicos de

polioxiétileno (PEO) (PEO-PPO-PEO) (Batrakova & Kabanov, 2008). Estes copolímeros apresentam propriedades únicas, incluindo a capacidade de formar micelas em meio aquoso acima da concentração micelar crítica (CMC) e da temperatura micelar crítica (CMT), encapsulando moléculas hidrofóbicas em seu núcleo PPO (Figura 5) (Alexandridis *et al*, 1995).

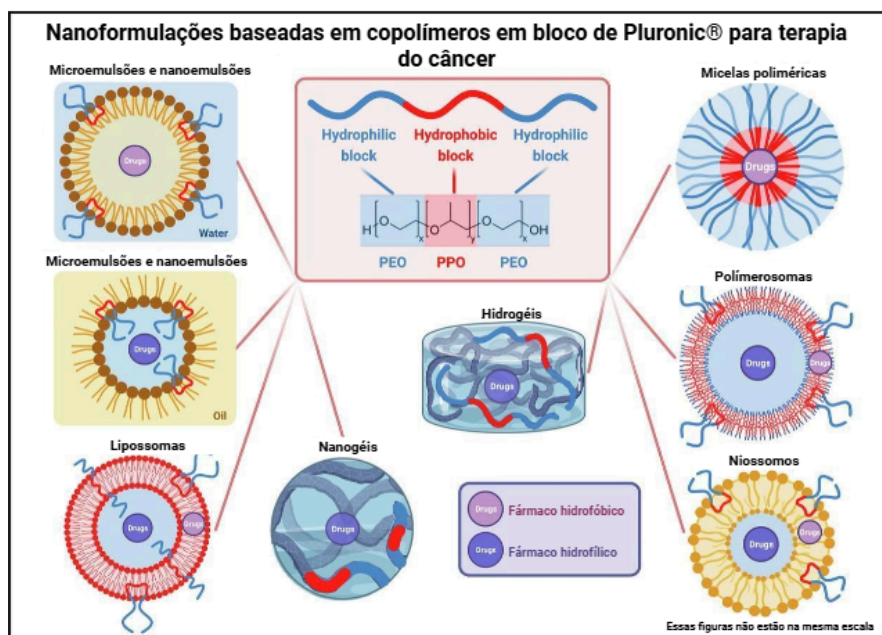


Figura 5 - Nanoformulações com Pluronic®. Fonte: Adaptado de Castro e colaboradores (2023) . Recursos de Biorender.com.

As propriedades físico-químicas e o comportamento micelar dos Pluronicos dependem do comprimento relativo dos blocos de PEO e PPO, que varia entre os diferentes tipos de Pluronicos (Kabanov *et al.*, 2002). O Pluronic® F-127 (Poloxamer 338) caracteriza-se por apresentar elevado peso molecular (≈ 14.600 g/mol) e elevada proporção de PEO ($\approx 80\%$), resultando em maior hidrofília e estabilidade micelar em comparação com outros Pluronicos (Pourbakhsh, 2025).

Como sistema de entrega de fármacos, os Pluronicos apresentam várias vantagens, incluindo biocompatibilidade, baixa toxicidade, capacidade de aumentar a solubilidade de fármacos hidrofóbicos, prolongar o tempo de circulação sanguínea, alterar a biodistribuição e modular a liberação do fármaco (Batrakova & Kabanov, 2008). Além disso, os Pluronicos podem interagir com membranas celulares, alterando sua fluidez e permeabilidade, potencialmente aumentando a captação celular de fármacos (Kabanov *et al.*, 2002).

Uma característica particularmente relevante dos Pluronicos para a terapia do câncer é sua capacidade de inibir a glicoproteína-P (P-gp), uma proteína de efluxo associada à resistência a múltiplas drogas (MDR) frequentemente super expressa em células tumorais (Pitto-Barry & Barry, 2014). Este efeito é atribuído à capacidade dos Pluronicos de afetar o metabolismo energético celular, reduzindo os níveis de ATP disponíveis para a função da P-gp, e de alterar a fluidez da membrana plasmática, comprometendo a atividade da P-gp (Batrakova & Kabanov, 2008).

No contexto da TFD, a vetorização de fotossensibilizadores por Pluronicos pode proporcionar múltiplos benefícios, incluindo aumento da solubilidade aquosa, redução da agregação, melhora da internalização celular e potencialização dos efeitos fotodinâmicos (Younus *et al.*, 2024). Estudos recentes demonstraram que micelas de Pluronic podem aumentar a eficácia da TFD mediada por diversos fotossensibilizadores, incluindo ftalocianinas (Figueiras *et al.*, 2022), hipericina (Barboza *et al.*, 2018) e clorinas (Borzecka *et al.*, 2021).

O Pluronic® F-127 , especificamente, apresenta características favoráveis para a vetorização da AICIPc, incluindo elevada capacidade de solubilização devido ao núcleo PPO relativamente grande e estabilidade micelar em meio fisiológico devido à extensa camada de PEO (Pourbakhsh, 2025). Além disso, a elevada proporção de PEO no Pluronic® F-127 pode conferir propriedades de "stealth" às micelas, reduzindo a opsonização e prolongando o tempo de circulação sanguínea *in vivo* (Kabanov *et al.*, 2002).

1.7 Importância da Pesquisa em Novos Tratamentos para o Câncer de Mama

A pesquisa em novas abordagens terapêuticas para o câncer de mama, especialmente para o subtipo triplo-negativo, é de suma importância, considerando a alta taxa de mortalidade associada a essa doença. A resistência aos tratamentos convencionais, como a quimioterapia, e a falta de opções terapêuticas eficazes tornam urgente a necessidade de explorar novas estratégias, como a terapia fotodinâmica, que não apenas visam as células tumorais, mas também o microambiente tumoral e a resposta imunológica do paciente (Oehler *et al.*, 2024).

A TFD, ao induzir morte celular programada e promover uma resposta imunológica, pode transformar a maneira como o câncer de mama é tratado, especialmente em casos de resistência a múltiplas drogas (Figura 6).

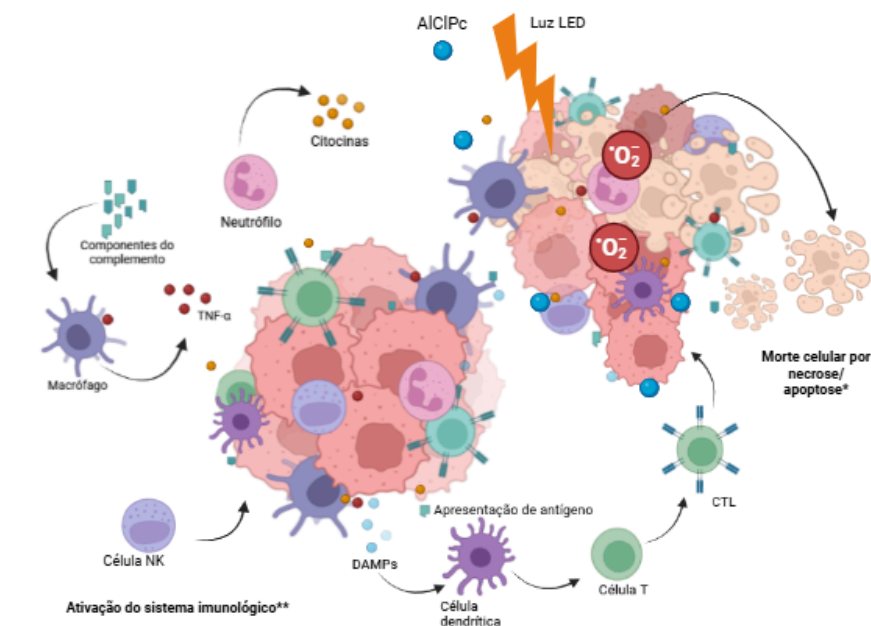


Figura 6 - Indução da imunidade antitumoral pela terapia fotodinâmica (PDT). O fotossensibilizador ativado por luz específica gera espécies reativas de oxigênio ($1O_2$, O_2^- , OH), eliminando células tumorais por apoptose, necrose e autofagia. A PDT induz inflamação aguda, liberando citocinas e DAMPs que recrutam neutrófilos e macrófagos para fagocitose tumoral. Células NK e dendríticas ativam o sistema imune adaptativo (CTLs, células B), intensificando a resposta antitumoral sistêmica. Fonte: Autoria própria, 2025. Recursos de Biorender.com

A integração de novas tecnologias, como a nanotecnologia, na entrega de terapias fotodinâmicas, também representa uma frente promissora na luta contra o câncer de mama. A personalização do tratamento com base nas características moleculares do tumor e na resposta individual do paciente pode levar a melhores resultados clínicos, reduzindo a toxicidade e melhorando a qualidade de vida das pacientes (Oehler *et al.*, 2024).

Diante do exposto, é evidente que o câncer de mama, especialmente o triplo-negativo, demanda uma abordagem multifacetada que considere tanto as características biológicas do tumor quanto às necessidades individuais das pacientes. A terapia fotodinâmica, combinada com sistemas de entrega inovadores como a nanotecnologia e Pluronic, representa uma estratégia inovadora e promissora que pode contribuir significativamente para o avanço no tratamento dessa doença devastadora.

Investigações futuras devem continuar a explorar a sinergia entre a TFD e outras modalidades terapêuticas, bem como a eficácia de novos fotossensibilizadores e

sistemas de entrega, visando sempre a melhoria dos desfechos clínicos e a qualidade de vida das pacientes com câncer de mama.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar os efeitos citotóxicos e antiproliferativos da terapia fotodinâmica com ftalocianina de alumínio cloro (AICIPc) vetorizada pelo copolímero Pluronic® F-127 em modelo in vitro de câncer de mama triplo-negativo (MDA-MB-231).

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a citotoxicidade da AICIPc livre e vetorizada por Pluronic® F-127, com e sem irradiação, em células MDA-MB-231;
- Investigar os efeitos da AICIPc livre e vetorizada por Pluronic® F-127 sobre a capacidade clonogênica de células MDA-MB-231 após irradiação;
- Analisar os efeitos da AICIPc livre e vetorizada por Pluronic® F-127 sobre a migração de células MDA-MB-231 após terapia fotodinâmica;
- Quantificar o potencial apoptótico e/ou necrótico da AICIPc vetotorizada em células MDA-MB-231.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes, equipamentos utilizados e linhagem celular

A ftalocianina de alumínio cloro (AICIPc) juntamente com o copolímero Pluronic® F-127 foram gentilmente fornecidos pelo Prof. Bruno Henrique Vilsinski do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). O dimetilsulfóxido (DMSO), brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), violeta cristal e iodeto de propídio foram adquiridos da Invitrogen™. O Meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) e solução de antibióticos (contendo penicilina, estreptomicina e neomicina) foram obtidos da Gibco (Life Technologies). O soro fetal bovino (SFB) foi adquirido da Cultiab. A solução de tripsina/EDTA foi adquirida da Vitrocell. O azul de trypan utilizado no ensaio de viabilidade e proliferação foi adquirido da Sigma-Aldrich. Todos os outros utilizados foram de alto grau analítico.

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano triplo-negativo MDA-MB-231 foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Rio de Janeiro, Brasil) (Holliday & Speirs, 2011) e inicialmente, foi armazenada em freezer Forma 88000 Series (Thermo Scientific), a -80°C, e para uso posterior, foi congelada e armazenada segundo protocolo em nitrogênio líquido (Hubley *et al.*, 2014).

A aquisição de imagens do ensaio de cicatrização foi realizada no microscópio de fluorescência invertido Olympus CKX53 com câmera acoplada. Para avaliar a atividade mitocondrial, foi utilizado o citômetro de fluxo Cytoflex.

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias e Obesidade da Universidade Federal de Juiz de Fora (LIDIPO-UFJF) e Laboratório Integrado de Pesquisa (LIP-UFJF).

3.2 Delineamento experimental

Este estudo visou avaliar os efeitos do composto de Ftalocianina de Alumínio-Cloro associado com o carreador Pluronic em células tumorais da linhagem MDA-MB-231 expostas à luz. Após a incubação, foram realizados ensaios de viabilidade celular e atividade mitocondrial, análise do potencial apoptótico, ensaio clonogênico e de cicatrização. Cada experimento foi realizado de acordo com os

grupos controles e tratados em triplicatas e pelo menos três repetições independentes para garantir a validade dos resultados, conforme figura 7.

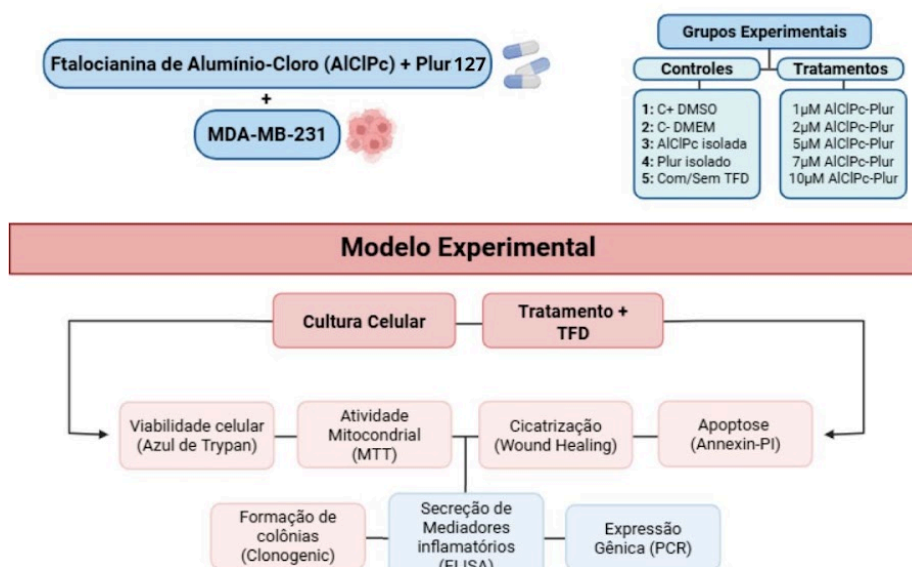


Figura 7 - Delineamento experimental. Fonte: Autoria própria, 2025. Recursos de Biorender.com.

3.3 Caracterização físico-química

O tamanho médio das micelas e índice de polidispersão (PDI) foram determinados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) utilizando Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Reino Unido) a 25°C, obtendo-se o relatório de distribuição de tamanho por intensidade (Size Distribution Report by Intensity) (Danaei *et al.*, 2018). O potencial zeta foi avaliado por mobilidade eletroforética no mesmo equipamento, gerando o relatório de potencial zeta (Zeta Potential Report) (Bhattacharjee, 2016). As amostras foram diluídas em água ultrapura (1:100) antes das medições.

A caracterização química e confirmação da encapsulação da AICIPc nas micelas de Pluronic® F-127 foi realizada por espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR). Os espectros foram obtidos utilizando espectrofotômetro FTIR na faixa de 4000-400 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} , identificando as bandas características dos componentes e suas possíveis interações (Stuart, 2004).

Os difratogramas de raios X foram obtidos, utilizando radiação $\text{Cu-K}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$), com varredura de 5° a 100° (2θ), passo de 0,02° e tempo de coleta de 1 s

por ponto. As amostras foram analisadas na forma de pó seco após preparo das formulações (Jenkins & Snyder, 1996).

3.4 Estudos in vitro

3.4.1 Cultura celular

Para a realização deste estudo foi utilizada a linhagem de células tumorais mamárias triplo negativas MDA-MB-231. As células MDA-MB-231 foram cultivadas em garrafas de cultura contendo o meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 1% de solução antibiótica. As células semeadas foram mantidas em estufa úmida, a 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂ (Freshney, 2010). As culturas foram subcultivadas quando necessário (confluência entre 80% e 90%) e mantidas em estufa até estarem adequadas para experimentos. Para tanto, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino (PBS) 1X estéril, a fim de retirar células mortas e resíduos do meio de cultura. Em seguida, foi adicionada a solução tripsina/EDTA 0,25% com o objetivo de desaderir as células das garrafas (Phelan; May, 2015). Posteriormente, foi adicionado meio de cultura suplementado com SFB, com o intuito de inativar a tripsina, e a solução contendo as células desaderidas foi centrifugada a 1500 rpm, por 5 minutos, a 4°C. O pellet formado foi ressuspenso em meio suplementado correspondente e as células foram novamente semeadas, cultivadas da forma supracitada e utilizada em ensaios experimentais diversos.

3.4.2 Irradiação para terapia fotodinâmica

A irradiação das células foi realizada utilizando sistema de LED vermelho (660 ± 40 nm) desenvolvido especificamente para este estudo pela equipe do Prof. Bruno Henrique Vilsinski por 30min após o período de tratamento pré-estabelecido de 4 horas (Abrahamse; Hamblin, 2016).

3.4.3 Ensaio de exclusão por Azul de Trypan

Para este ensaio, 1×10^4 células MDA-MB-231 foram semeadas, por poço, em placas de 96 poços, contendo 100 µL de meio DMEM suplementado com 1% de SFB

e 1% de solução de antibióticos e mantidas por 24 horas para adesão, em estufa úmida, à 37°C, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após o tempo estipulado, as células foram lavadas com PBS 1X e, em seguida, incubadas com os tratamentos correspondentes (Tabela 2) por 4 horas e posterior exposição à luz LED (660 ± 40 nm) por 30 minutos, enquanto as placas controles foram mantidas no escuro.

Tabela 2 - Grupos de tratamentos experimentais.

Grupos de tratamento	
Com exposição à luz	Sem exposição à luz
Controle Positivo (DMSO)	Controle Positivo (DMSO)
Controle Negativo (DMEM)	Controle Negativo (DMEM)
MDA-MB-231+AICIP _c	MDA-MB-231+AICIP _c
MDA-MB-231+Pluronic127	MDA-MB-231+Pluronic127
MDA-MB-231+AICIP _c + Pluronic® F-127	MDA-MB-231+AICIP _c + Pluronic® F-127

*DMSO: dimetilsulfóxido; DMEM: Meio Eagle modificado por Dulbecco; AICIP_c: Ftalocianina de Alumínio-Cloro. Fonte: Autor (2025).

Para cada condição foram feitas triplicatas técnicas, em três ensaios independentes. Após o período de tratamento, o meio foi substituído por meio DMEM suplementado com 1% de SFB e 1% de antibiótico e mantidas em estufa úmida por mais 24 horas. As células foram tripsinizadas (50 µL/poço) e fora adicionado meio de cultura contendo 10% de SFB para inativação da tripsina (50 µL/poço). Em seguida, as células foram diluídas no corante azul de trypan, para verificar a perda de seletividade da membrana plasmática, já que essa substância penetra apenas células cuja membrana plasmática não se encontra íntegra, infiltrando-se no citoplasma e, dessa forma, indicando morte celular (Strober, 2015). As células vivas (incolores) e mortas (coradas), foram contadas na câmara de Neubauer com o auxílio de um microscópio de luz. Os dados obtidos foram convertidos em porcentagem de células vivas em relação ao número total (células vivas + não vivas).

3.4.4 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliação da citotoxicidade, foi realizado o ensaio de cristal violeta, baseado na quantificação de células aderidas após tratamento (Feoktistova *et al.*, 2016). As células foram cultivadas em placas de 24 poços e, ao final do período experimental, o meio de cultura foi cuidadosamente removido e os poços foram lavados com PBS 1x para eliminar células não aderidas. Em seguida, foi adicionada a cada poço solução de cristal violeta a 0,5% preparada em metanol absoluto, que atuou simultaneamente como fixador e corante. A placa foi incubada por 15 minutos à temperatura ambiente e protegida da luz. Após esse período, os poços foram lavados com água destilada até remoção completa do excesso de corante e a placa foi deixada para secar sobre papel absorvente. Para a solubilização do corante retido nas células viáveis e aderidas, adicionou-se 500 µL de ácido acético a 4% por poço, com incubação de 10 minutos. Em seguida, foram transferidas alíquotas de 200 µL para uma placa de 96 poços e a absorbância foi lida em 570 nm. Os valores obtidos foram utilizados para estimar a viabilidade celular relativa entre os grupos tratados e controle.

3.4.5 Ensaio de atividade mitocondrial (MTT)

Após avaliação da integridade da membrana das células de linhagem tumoral MDA-MB-231 foi performedo o ensaio de MTT. Ensaio colorimétrico que consiste na redução do brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio em cristais de formazan pelas desidrogenases mitocondriais das células metabolicamente viáveis, mensurado então, o efeito citotóxico da AICIPc livre e encapsulada em micelas de Pluronic® F-127 , com e sem irradiação (Mosmann, 1983).

Para tal, células MDA-MB-231 (1×10^4 células/poço) foram semeadas em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com concentrações crescentes de AICIPc-Pluronic® F-127 (1-10 µM) bem como os grupos controles por 4 horas, após esse período, metade das placas foi submetida à irradiação, enquanto a outra metade foi mantida no escuro. Após o período de tratamento, os poços foram lavados com PBS 1X e foram adicionados, por poço, 90 µL de meio de cultura DMEM suplementado e 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL), e a placa pode ser novamente incubada em estufa úmida, nas mesmas condições anteriores, por 4 horas. Em seguida, o meio contendo MTT foi aspirado de cada poço e substituído por 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) por poço, a fim de solubilizar os cristais de formazan.

A viabilidade celular foi avaliada imediatamente após o tempo de exposição assim como após 24h de incubação posterior ao período de exposição pelo ensaio de MTT, garantindo que seja possível verificar a toxicidade aguda do composto nas células logo após a exposição bem como os efeitos a longo prazo da ftalocianina, considerando a possível internalização e o efeito residual do composto nas células (Van Meerloo *et al.*, 2011).

A absorbância foi medida a 540 nm utilizando espectrofotômetro de microplacas Agilent Biotek Epoch™. A viabilidade celular foi calculada como porcentagem em relação às células não tratadas. Os valores de IC₅₀ (concentração que inibe 50% da viabilidade celular) foram calculados utilizando regressão não-linear no software GraphPad Prism 9.3.0 (Sebaugh, 2011).

3.4.6 Ensaio clonogênico

O ensaio clonogênico representa um método fundamental para avaliar a capacidade de células individuais manterem seu potencial proliferativo e formarem colônias após tratamentos citotóxicos, fornecendo informações cruciais sobre a eficácia terapêutica em longo prazo (Franken *et al.*, 2006). Este ensaio é particularmente relevante na avaliação de terapias antineoplásicas, uma vez que reflete a capacidade de sobrevivência e repopulação tumoral, aspectos diretamente relacionados ao sucesso terapêutico e à prevenção de recidivas.

Células MDA-MB-231 (5×10^2 células/poço) foram semeadas em placas de 6 poços e incubadas por 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes condições de tratamento (Tabela 2) por 4 horas e posterior exposição à irradiação ou mantidas no escuro. As células foram então incubadas por 7 dias, com troca de meio a cada 3 dias. Ao final do período de incubação, as colônias foram fixadas com paraformaldeído 4% por 10 minutos e coradas com violeta cristal 0,5% por 15 minutos (Rafehi *et al.*, 2011). As colônias contendo mais de 50 células foram contadas utilizando microscópio estereoscópico.

A eficiência de formação de colônias (EFC) foi calculada pela seguinte equação: $EFC = (\text{Número de colônias formadas} / \text{Número de células semeadas}) \times 100$. As imagens obtidas foram utilizadas para quantificar as colônias com o auxílio do software ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

3.4.7 Ensaio de cicatrização (wound healing)

O efeito da terapia fotodinâmica mediada por AICIPc livre ou AICIPc-Pluronic® F-127 sobre a migração celular foi avaliado pelo ensaio de cicatrização (wound healing) (Liang *et al.*, 2007). Células MDA-MB-231 (2×10^5 células/poço) foram semeadas em placas de 24 poços e incubadas até atingirem 90% de confluência. Uma "ferida" foi criada na monocamada celular utilizando ponteira de 200 μ L. As células foram lavadas com PBS para remover células não aderidas e tratadas com as concentrações de trabalho (Tabela 2) por 4 horas em meio contendo 1% de SFB para minimizar a proliferação celular. Após o tratamento as células foram submetidas à irradiação ou mantidas no escuro.

O fechamento da "ferida" foi monitorado por microscopia em fase de contraste nos tempos 0, 24 e 48 horas. Imagens foram capturadas utilizando microscópio invertido (Olympus IX71) e a área da "ferida" foi quantificada utilizando o software ImageJ (NIH, EUA) (Jonkman *et al.*, 2014). A porcentagem de fechamento da ferida foi calculada em relação ao tempo zero:

$$\% \text{ Fechamento} = [(\text{Área}_{0h} - \text{Área}_{24h}) / \text{Área}_{0h}] \times 100$$

3.4.8 Ensaio de Apoptose

Para a avaliação da indução de apoptose após os tratamentos com AICIPc, Pluronic® F-127 e suas combinações com e sem irradiação, foi realizado ensaio por citometria de fluxo utilizando dupla marcação com anexina V-FITC/iodeto de propídio (PI) (Riccardi & Nicoletti, 2006). As células da linhagem MDA-MB-231 (1×10^5 células/poço) foram cultivadas em placas de 6 poços por 24 horas, tratadas de acordo com os grupos experimentais (Tabela 2) por 4 horas, seguidas ou não de irradiação com luz LED (660 ± 40 nm) por 30 minutos, e incubadas por mais 24 horas.

Após o tratamento, as células foram cuidadosamente coletadas, lavadas com PBS 1X e ressuspensas em tampão de ligação (binding buffer 1X) a uma concentração de 1×10^6 células/mL. Em seguida, foram adicionados 5 μ L de Anexina V-FITC e 5 μ L de PI por tubo, com posterior incubação por 15 minutos à temperatura ambiente, protegidas da luz (Crowley *et al.*, 2016). As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (Cytotflex, Beckman Coulter), adquirindo-se pelo menos 10.000 eventos por amostra.

As células foram classificadas em quatro populações: Células viáveis (Anexina V-/PI-); em apoptose precoce (Anexina V+/PI-); em apoptose tardia (Anexina V+/PI+); e necrose (Anexina V-/PI+).

3.4.9 Análise Estatística

A análise estatística foi conduzida com o auxílio do software GraphPad Prism (versão 9.3.0).

Para comparação entre múltiplos grupos experimentais, foram utilizados testes de ANOVA (análise de variância), conforme apropriado para o delineamento de cada experimento: ANOVA de uma via (One-way ANOVA) foi aplicada quando se avaliava o efeito de um único fator (ex.: tratamento); ANOVA de duas vias (Two-way ANOVA) foi aplicada nos casos em que se consideravam dois fatores simultaneamente, como tratamento e tempo ou tratamento e presença/ausência de luz (Glantz & Slinker, 2001).

Em todos os casos, quando identificadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$), foram aplicados pós-testes múltiplos para comparação entre os grupos: Tukey foi utilizado para comparações entre todos os pares de grupos; Sidak ou Bonferroni foram aplicados em comparações específicas planejadas entre grupos selecionados (Abdi; Williams, 2010).

A escolha entre os testes pós-hoc foi baseada na adequação ao número de comparações e controle de erro tipo I. Os níveis de significância estatística foram indicados da seguinte forma nos gráficos e tabelas:

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; **** $p < 0,0001$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização físico-química da formulação AICIPc-Pluronic® F-127

4.1.1 Distribuição de Tamanho e índice de polidispersão (PDI)

A análise por espalhamento dinâmico de luz (DLS) revelou que as micelas de Pluronic® F-127 contendo ftalocianina de alumínio-cloro (AICIPc) apresentaram um tamanho médio (Z-average) de 329,6 nm, com um índice de polidispersão (PDI) de 0,649 (Figura 8). Este tamanho é considerado adequado para a aplicação em terapia fotodinâmica, uma vez que nanopartículas na faixa de 100-500 nm podem se acumular preferencialmente em tecidos tumorais através do efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (EPR) (Maeda *et al.*, 2013).

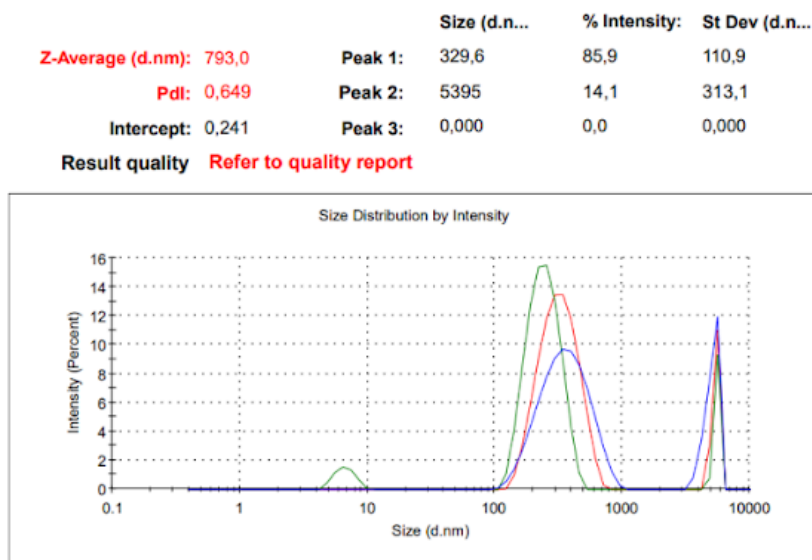


Figura 8 - Distribuição de tamanho e índice de polidispersão por Zeta Sizer. Fonte: Autoria própria, 2025.

O valor de PDI observado (0,649) indica uma distribuição de tamanho relativamente heterogênea. Valores de PDI abaixo de 0,3 são tipicamente considerados indicativos de uma população monodispersa, enquanto valores acima de 0,5 sugerem polidispersidade significativa (Danaei *et al.*, 2018). A análise da distribuição de tamanho por intensidade revelou a presença de três populações distintas, com picos em 110 nm (85,9% da intensidade), 313 nm (14,1% da intensidade) e 5395 nm (0,0% da intensidade). A presença dessas diferentes populações pode ser atribuída a diferentes estados de agregação das micelas no sistema coloidal.

A heterogeneidade observada pode ser resultante do processo de auto-organização do copolímero Pluronic® F-127 durante a formação das micelas, especialmente na presença do fotossensibilizador hidrofóbico AICIPc, que pode influenciar a dinâmica de micelização (Alexandridis *et al.*, 1995). Além disso, a natureza anfifílica do Pluronic® F-127 pode levar à formação de estruturas micelares com diferentes morfologias e tamanhos, dependendo das condições específicas de preparação e da interação entre o copolímero e a AICIPc (Kabanov *et al.*, 2002).

4.1.2 Potencial Zeta e Estabilidade Coloidal

O potencial zeta das micelas AICIPc-Pluronic® F-127 foi determinado como $-19,8 \pm 5,49$ mV e condutividade de 0,0201 mS/cm (Figura 9). Este valor negativo indica a presença de cargas superficiais que contribuem para a estabilidade do sistema coloidal por repulsão eletrostática. Em geral, esta faixa de potencial zeta (-15 a -30 mV) é adequado para aplicações biomédicas, proporcionando estabilização suficiente para manter a dispersão das nanopartículas em meio fisiológico, sem comprometer significativamente a interação celular (Honary & Zahir, 2013).

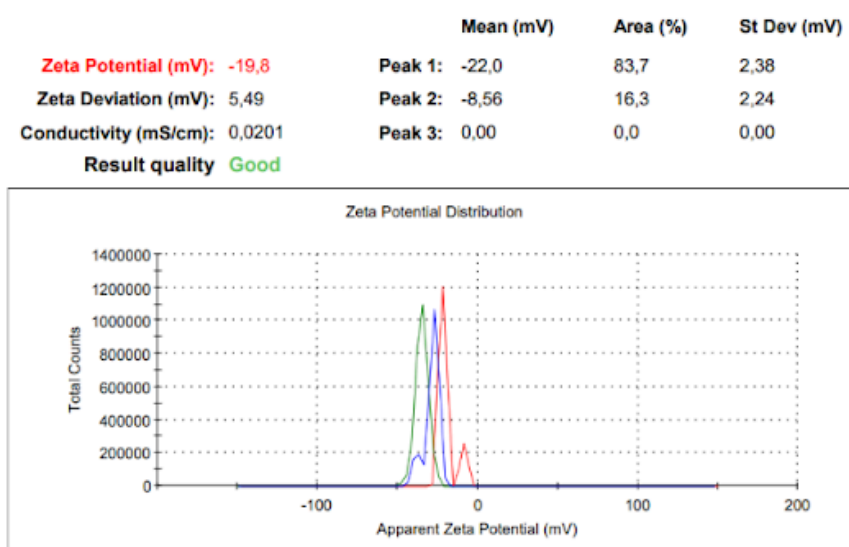


Figura 9 - Potencial Zeta por Zeta Sizer. Fonte: Autoria própria, 2025.

O valor obtido (-19,8 mV) pode ser atribuído aos grupos óxido de etileno (EO) terminais do copolímero tribloco, que, em pH fisiológico, tendem a adquirir carga parcialmente negativa. Esta característica superficial é vantajosa para a terapia

fotodinâmica por prevenir a agregação prematura do sistema, permitir a aproximação às células MDA-MB-231 sem repulsão excessiva e por facilitar a endocitose.

No entanto, este valor está próximo do limiar crítico de estabilidade (± 20 mV), indicando que o sistema pode ser suscetível a fenômenos de agregação ao longo do tempo ou em condições de estresse, como mudanças de temperatura, pH ou força iônica do meio (Bhattacharjee, 2016).

A distribuição do potencial zeta mostrou um pico principal em $-22,0$ mV (83,7% da área) e um pico secundário em $-8,56$ mV (16,3% da área), resultando em um valor médio de $-15,28$ mV para o potencial zeta. A presença de um pico com carga positiva sugere heterogeneidade na distribuição de cargas superficiais, possivelmente devido a diferentes orientações das cadeias de pluronic na superfície das micelas ou à presença de subpopulações com diferentes graus de incorporação da AICIPc.

4.1.3 Correlação entre Tamanho e Potencial Zeta

A correlação entre o tamanho das micelas e o potencial zeta oferece insights importantes sobre a estabilidade geral do sistema. O tamanho relativamente grande das micelas (329,6 nm) associado a um potencial zeta moderado ($-19,8$ mV) sugere que a estabilidade do sistema pode ser mantida por uma combinação de repulsão eletrostática e impedimento estérico proporcionado pelas cadeias de polioxietileno hidrofílicas do Pluronic® F-127 (Elsabahy & Wooley, 2012).

No contexto da aplicação em terapia fotodinâmica para câncer de mama triplo-negativo, esse balanço entre tamanho e estabilidade é crucial. Micelas de tamanho adequado podem facilitar o acúmulo no tecido tumoral via efeito EPR, enquanto a estabilidade coloidal moderada pode permitir a manutenção da integridade do sistema durante o transporte e armazenamento, mas também possibilitar a liberação controlada do fotossensibilizador no ambiente tumoral em resposta a alterações no microambiente (Alibolandi *et al.*, 2015).

4.1.4 Análise Espectroscópica por FTIR

A análise por espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada para caracterizar as formulações desenvolvidas, comparando-se a amostra de ftalocianina de alumínio-cloro com goma galana (AICIPc + goma galana) e

a formulação contendo o peptídeo p338 (Pluronic F-127) (AICIPc + p338 + goma galana) (Figura 10).

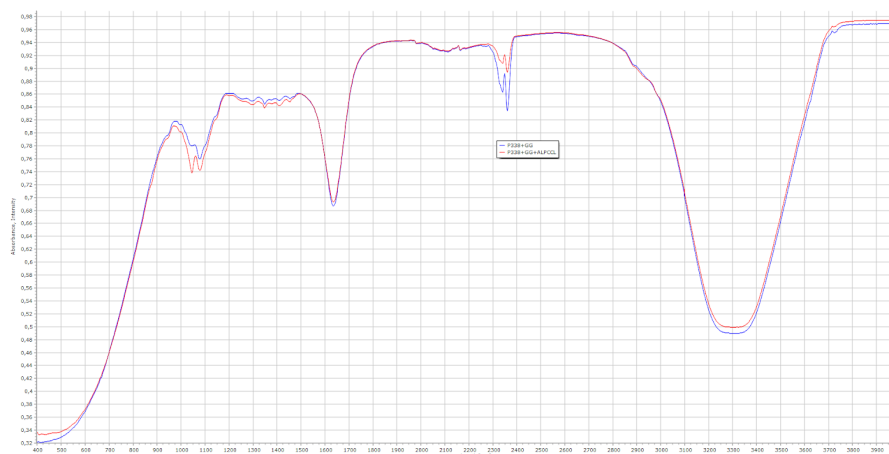


Figura 10 - Espectros de FTIR das formulações desenvolvidas. Comparação entre AICIPc + goma galana (linha vermelha) e AICIPc + P338 + goma galana (linha azul) na região de 400-4000 cm^{-1} . Os espectros mostram alta similaridade entre as formulações, indicando preservação da integridade estrutural dos componentes após incorporação do peptídeo P338. Fonte: Elaboração própria (2025).

Os espectros FTIR das duas formulações apresentaram perfis espectrais muito similares, indicando que a incorporação do peptídeo p338 não promoveu alterações significativas na estrutura química global da formulação. As principais bandas de absorção identificadas foram:

- **Região de 3200-3600 cm^{-1} :** Banda larga e intensa correspondente aos estiramentos O-H da goma galana, característicos dos grupos hidroxila presentes na estrutura polissacarídica (Mathlouthi & Koenig, 1987; Rochas *et al.*, 1986).
- **Região de 2800-3000 cm^{-1} :** Bandas de estiramento C-H alifático, provenientes tanto da cadeia carbônica da goma galana quanto de grupos metil e metileno presentes na estrutura da ftalocianina (Kumar *et al.*, 2005).
- **Região de 1600-1700 cm^{-1} :** Bandas características do anel macrocíclico da ftalocianina, correspondentes aos estiramentos C=C e C=N do sistema aromático conjugado (Giordano, 2005; Ogunsipe *et al.*, 2003).
- **Região de 1000-1200 cm^{-1} :** Bandas intensas atribuídas aos estiramentos C-O dos grupos glicosídicos da goma galana, região característica de polissacarídeos (Mathlouthi & Koenig, 1987; Synytsya & Novak, 2013).

- **Região de 700-900 cm⁻¹:** Bandas características das deformações C-H fora do plano do anel da ftalocianina, confirmando a presença do fotossensibilizador nas formulações (Kumar *et al.*, 2005).

A similaridade entre os espectros das duas formulações sugere que a interação entre o peptídeo p338 e os demais componentes da formulação não resulta em formação de novas ligações químicas covalentes, mas provavelmente envolve interações não-covalentes como forças de van der Waals, ligações de hidrogênio ou interações eletrostáticas. Esta observação é importante do ponto de vista farmacotecnológico, pois indica que a integridade química tanto da ftalocianina quanto do peptídeo é preservada na formulação.

A presença das bandas características da ftalocianina de alumínio-cloro em ambas as formulações confirma a estabilidade do fotossensibilizador durante o processo de incorporação na matriz polimérica. As bandas na região de 1600-1700 cm⁻¹, características do sistema π -conjugado da ftalocianina, mantiveram-se inalteradas, indicando que não houve degradação ou alteração estrutural significativa do cromóforo responsável pelas propriedades fotofísicas do composto (Ogunsipe *et al.*, 2003; Giordano, 2005).

A goma galana, utilizada como carreador polimérico, apresentou suas bandas características bem definidas, especialmente as relacionadas aos grupos hidroxila (3200-3600 cm⁻¹) e às ligações glicosídicas (1000-1200 cm⁻¹), confirmando sua integridade estrutural e adequação como matriz para o sistema de liberação. Segundo Mathlouthi e Koenig (1987), cinco regiões de frequência podem ser distinguidas na análise estrutural de polissacarídeos: (1) região de estiramentos OH e CH em 3600-2800 cm⁻¹; (2) região de simetria local em 1500-1200 cm⁻¹; (3) região de estiramento CO em 1200-950 cm⁻¹; (4) região fingerprint ou anomérica em 950-700 cm⁻¹; e (5) região esquelética abaixo de 700 cm⁻¹.

A ausência de deslocamentos significativos nas bandas principais entre as duas formulações sugere que a incorporação do peptídeo p338 não altera substancialmente o ambiente químico dos componentes principais, o que é desejável para manter as propriedades fotofísicas da ftalocianina e a funcionalidade biológica do peptídeo. Estudos anteriores com complexos de ftalocianina demonstraram que a caracterização estrutural por espectroscopia no infravermelho pode indicar quando parte da ftalocianina está localizada dentro de cavidades específicas, afetando tanto propriedades fotofísicas quanto fotoquímicas.

A técnica de FTIR tem se mostrado uma ferramenta valiosa para a identificação e caracterização de polissacarídeos em sistemas complexos (Synytsya & Novak, 2013), permitindo confirmar a integridade dos componentes ativos nas formulações desenvolvidas e fornecendo informações estruturais importantes para o desenvolvimento farmacotecnológico de sistemas de liberação baseados em ftalocianinas.

4.1.5 Difração de raios X (DRX)

O padrão de difração de raios X (DRX) obtido para a formulação composta por ftalocianina de alumínio cloro (AICIPc) associada ao copolímero Pluronic® F-127 revelou um perfil característico de materiais semicristalinos e amorfos. Observou-se um pico de difração de maior intensidade em $2\theta \approx 25^\circ$, sugerindo a presença de domínios parcialmente ordenados, atribuíveis à organização molecular da AICIPc (Figura 11).

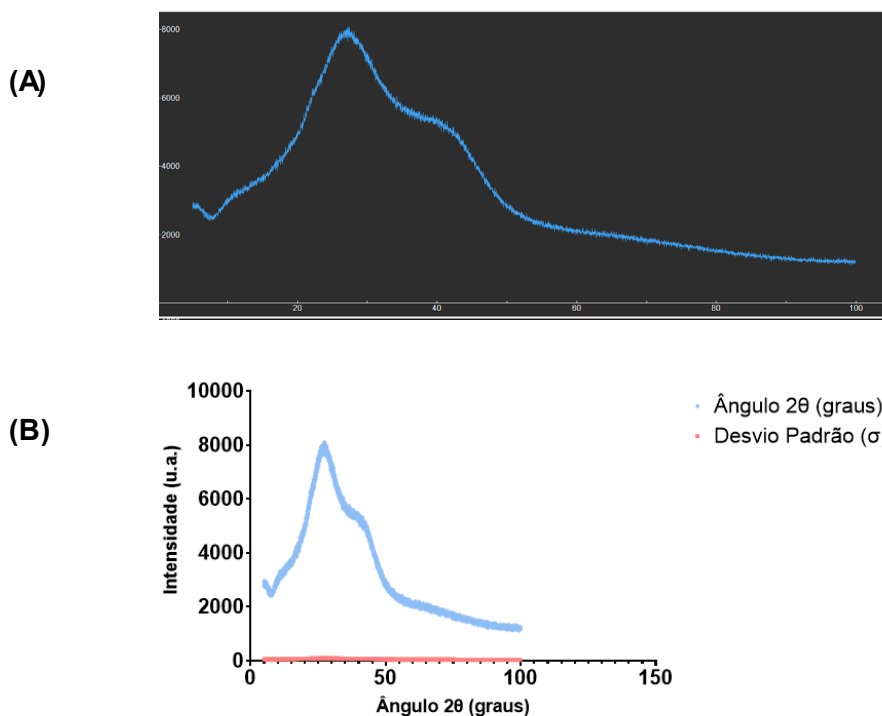


Figura 11 - Difratoograma de raios X da formulação de AICIPc conjugada com P338. (A) Gráfico obtido no software Fityk, com ajuste gaussiano aplicado ao pico de menor intensidade. (B) Representação gráfica no GraphPad Prism com os valores exportados do Fityk, incluindo curva de intensidade e desvio padrão (σ). Observa-se um pico de maior intensidade em $2\theta \approx 25^\circ$ (2θ), atribuível à estrutura ordenada parcial de AICIPc, e uma ampla região de baixa intensidade, característica de materiais amorfos, relacionado ao perfil difrativo do Pluronic® F-127. Fonte: Autoria própria, 2025.

Adicionalmente, a presença de um halo amorfo difuso de baixa intensidade ao longo do intervalo de 2θ entre 30° e 80° indica uma contribuição significativa do Pluronic® F-127, um copolímero de bloco não iônico conhecido por seu caráter predominantemente amorfo. Os copolímeros Pluronic (poloxâmeros) são compostos por blocos de poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno) (PEO-PPO-PEO) e apresentam natureza anfifílica, com propriedades estruturais que favorecem a formação de regiões amorfas em sistemas poliméricos (Cabana *et al.*, 1997; Batrakova & Kabanov, 2008).

A análise por DRX de polímeros semicristalinos demonstra que estes materiais nunca são 100% cristalinos devido a imperfeições estereoquímicas, presença de ramificações nas cadeias e dependência da taxa de cristalização (Beaucage, 2023). A ausência de picos de difração bem definidos na região de maior ângulo reforça a natureza predominantemente desorganizada do copolímero Pluronic na matriz da formulação.

Dessa forma, os dados de DRX sugerem que a incorporação da AICIPc ao Pluronic® F-127 não compromete totalmente a organização molecular da ftalocianina, preservando características estruturais relevantes para sua atividade fotodinâmica, ao mesmo tempo em que promove maior estabilidade e dispersibilidade à formulação. Este resultado é consistente com estudos que demonstram a capacidade dos copolímeros Pluronic de atuar como carreadores eficazes para fármacos fotossensibilizadores, mantendo suas propriedades terapêuticas (Batrakova; Kabanov, 2008).

4.1.6 Estabilidade Coloidal e Implicações para a Eficácia Terapêutica

A análise integrada dos parâmetros físico-químicos obtidos para o sistema AICIPc-Pluronic® F-127 revela um perfil de estabilidade coloidal adequado para aplicações em terapia fotodinâmica, com diâmetro hidrodinâmico médio de 793,0 nm e índice de polidispersão de 0,649, indicando uma distribuição bimodal com populações de 329,6 nm (85,9%) e 5395 nm (14,1%), onde o tamanho médio de 329,6 nm posiciona-se favoravelmente para internalização celular por endocitose, que constitui o principal mecanismo de captação de nanopartículas por células tumorais (Sahay *et al.*, 2010), e penetração em tecidos tumorais através do efeito de

permeabilidade e retenção aumentada (EPR), característico de neoplasias malignas (Zhang *et al.*, 2023).

O potencial zeta de -19,8 mV, com distribuição bimodal (-22,0 mV para 83,7% e -8,56 mV para 16,3% das partículas), posiciona o sistema na faixa de estabilidade coloidal moderada conforme a teoria DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek), sendo que valores na faixa de -15 a -30 mV proporcionam repulsão eletrostática suficiente para prevenir agregação extensiva (Silva *et al.*, 2024), mantendo simultaneamente condições favoráveis para interações biológicas enquanto facilita a interação com domínios carregados positivamente das membranas celulares (Rodriguez *et al.*, 2024), particularmente relevante para células MDA-MB-231 de câncer de mama triplo-negativo, uma vez que partículas carregadas negativamente podem apresentar melhor desempenho em células com carga positiva, além de afetar dramaticamente a estabilidade das formas farmacêuticas e taxa de liberação (Patel & Singh, 2024).

A arquitetura molecular do copolímero tribloco Pluronic® F-127, com blocos de óxido de etileno (EO) e óxido de propileno (PO) em configuração EO-PO-EO, confere estabilização estérica adicional ao sistema, uma vez que os copolímeros Pluronic tribloco têm sido extensivamente utilizados para preservar a estabilidade óptica e coloidal de sistemas nanoestruturados em fluidos biológicos (Yolanda *et al.*, 2022; Chen *et al.*, 2023). Este tipo de copolímero atua como estabilizante não-iônico reduzindo a tensão interfacial e proporcionando barreira estérica contra agregação. Enquanto isso, a análise por difração de raios X revelou um perfil amorfo predominante com pico cristalino centrado em aproximadamente 25°, sugerindo manutenção da estrutura cristalina parcial do AICIPc mesmo após encapsulação, sendo esta característica relevante para a estabilidade coloidal, uma vez que a transição para estado amorfo pode afetar a cinética de liberação e a estabilidade termodinâmica do sistema (Kumar *et al.*, 2024), além de preservar as propriedades fotofísicas essenciais para geração de espécies reativas de oxigênio, fundamental para a eficácia da terapia fotodinâmica, já que alterações significativas na estrutura molecular do fotossensibilizador podem comprometer sua capacidade de produção de oxigênio singlete (Oliveira *et al.*, 2023).

Contudo, a heterogeneidade do sistema, evidenciada pelo elevado índice de polidispersão (PDI = 0,649) e pela presença de múltiplas populações na distribuição de tamanho e potencial zeta, representa um desafio para a previsibilidade do

comportamento biológico, podendo resultar em variabilidade na captação celular, cinética de liberação do fotossensibilizador e, conseqüentemente, na eficácia fototóxica final (Kumar; Patel & Singh, 2024), enfatizando a necessidade de otimização adicional da formulação para aumentar a homogeneidade do sistema e maximizar a eficácia terapêutica.

A combinação de estabilização eletrostática (potencial zeta negativo) e estérica (corona de Pluronic) confere ao sistema características desejáveis para veiculação eficaz do fotossensibilizador AICIPc, mantendo integridade estrutural em condições fisiológicas enquanto permite interação controlada com células tumorais. Isso se dá devido aos parâmetros que proporcionam informações sobre estabilidade, tempo de circulação, interações proteicas, permeabilidade e biocompatibilidade das nanopartículas (Martinez *et al.*, 2023), estabelecendo a base científica necessária para compreender o comportamento biológico esperado. E, além disso, orientando as estratégias de otimização formulativa, embora a validação experimental das propriedades biológicas preditas através de ensaios *in vitro* específicos constitua o próximo passo fundamental para confirmar o potencial terapêutico do sistema desenvolvido e estabelecer os parâmetros operacionais ideais para aplicação clínica futura.

4.2 Estudos *in vitro* em células MDA-MB-231

4.2.1 Fototoxicidade e citotoxicidade

4.2.1.1 Ensaio de Azul de Trypan

Os resultados do ensaio de azul de trypan demonstram que a terapia fotodinâmica com AICIPc-Pluronic® F-127 induziu significativa redução da viabilidade celular em células MDA-MB-231 de forma dose e tempo-dependente. A análise estatística por ANOVA de duas vias revelou diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,001$), tempos ($p < 0,001$) e interação tratamento \times tempo ($p < 0,001$), confirmando que os efeitos observados são estatisticamente robustos.

Os tratamentos sem irradiação (controles de citotoxicidade no escuro) confirmaram a segurança do conjugado na ausência de luz. A análise estatística revelou que não houve diferença significativa (*ns*) entre os controles (C+, C-, Plur, AICIPc) (Figura 12A) e as diferentes concentrações de AICIPc (1-10 μ M) em nenhum

dos tempos avaliados, e apenas algumas concentrações apresentaram diferenças pontuais ($*p < 0,05$) em relação aos controles, mas a viabilidade celular manteve-se consistentemente alta ($>90\%$) em todos os grupos. Além disso, a ausência de citotoxicidade significativa no escuro confirma que o conjugado AICIPc-Pluronic® F-127 não apresenta toxicidade intrínseca relevante, sendo ativada especificamente pela luz.

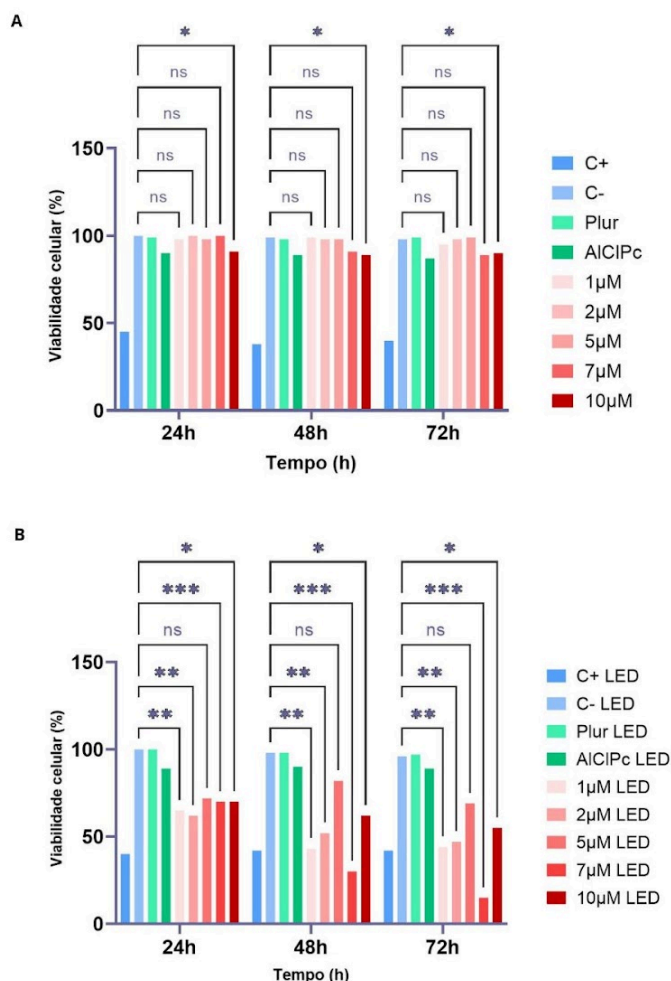


Figura 12 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de azul de trypan em células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações de AICIPc-Pluronic® F-127 (1-10 μM) sem irradiação com LED (terapia fotodinâmica) (A) e com terapia fotodinâmica (B). LED: células expostas à luz de LED 660-690nm; C+: controle positivo com DMSO 10%; C-: Controle negativo com DMEM suplementado com 10% SFB e 2% de antibiótico; AICIPc: Ftalocianina de Alumínio-cloro isolada; Plur: Pluronic® F-127 isolado. A viabilidade celular foi avaliada em 24h, 48h e 72h pós-tratamento. Dados expressos como percentual médio de células viáveis. Análise estatística realizada por ANOVA de duas vias seguida de pós-teste de Tukey para comparações múltiplas no GraphPad Prism. $*p < 0,05$; $p < 0,01$; $***p < 0,001$ comparado ao controle negativo no mesmo período de tempo; *ns* = não significativo. Fonte: Autoria própria, 2025.**

Quando realizada, a aplicação da terapia fotodinâmica demonstrou eficácia citotóxica significativa e estatisticamente robusta. As concentrações de 5 μM , 7 μM e

10 μM de AICIPc + LED apresentaram redução altamente significativa da viabilidade celular ($***p < 0,001$) em comparação aos controles em todos os tempos avaliados, enquanto as concentrações de 1 μM e 2 μM mostraram efeito significativo ($**p < 0,01$) em 24h, com manutenção ou intensificação do efeito ao longo do tempo. No entanto, nenhum dos controles (C+ LED, C- LED, Plur LED, AICIPc LED) apresentaram diferenças significativas entre si (*ns*), confirmando que a irradiação LED isoladamente não é citotóxica (Figura XB). Podendo observar a possibilidade de que exista um padrão dose-dependente, com maior redução da viabilidade celular nas concentrações mais altas de AICIPc-Pluronic® F-127.

Os ensaios de viabilidade celular mostraram que a AICIPc-Pluronic® F-127, na ausência de irradiação, não induziu citotoxicidade significativa nas células MDA-MB-231 em concentrações de até 2 μM após 24 e 48 horas de incubação, indicando a biocompatibilidade da formulação. No entanto, após a irradiação, observou-se uma redução significativa ($p < 0,001$) da viabilidade celular de maneira dependente da concentração.

A IC_{50} da AICIPc-Pluronic® F-127 após TFD foi de **2,31 μM** , demonstrando alta eficácia fototóxica em baixas concentrações. A formulação micelar provavelmente aumentou a eficácia do fotossensibilizador através de maior internalização celular e localização subcelular otimizada.

4.2.1.2 Ensaio de atividade mitocondrial (MTT)

A análise dos controles experimentais (Figura 13) revelou aspectos fundamentais para validação do modelo de terapia fotodinâmica (TFD). Os resultados demonstraram que a exposição aos componentes individuais (AICIPc ou Pluronic F127) não induziu toxicidade significativa às células MDA-MB-231, uma vez que a viabilidade celular permaneceu elevada e estatisticamente semelhante ao controle negativo (C-) mesmo após ativação por LED.

O controle negativo (C-) apresentou viabilidade celular de 100%, confirmando a ausência de toxicidade inespecífica do meio de cultivo, enquanto o controle positivo (C+) com DMSO 10% demonstrou alta citotoxicidade completa (33% de viabilidade), validando a sensibilidade do ensaio. Importante observar que a exposição à irradiação LED isoladamente não induziu morte celular significativa, demonstrando que a luz na faixa espectral utilizada (660-690nm) não possui efeito citotóxico por si, corroborando

com estudos prévios que estabelecem a necessidade da combinação fotossensibilizador-luz-oxigênio para a efetividade da TFD.

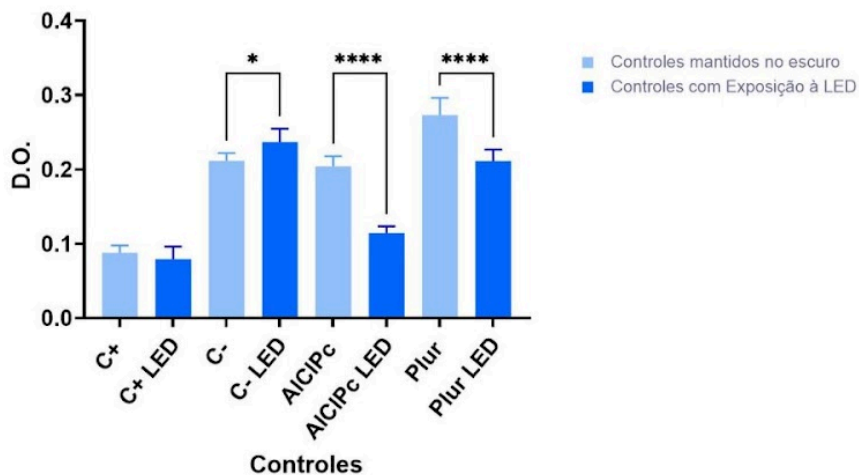


Figura 13 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células MDA-MB-231. Grupos controle: (C-) células tratadas com meio de cultura DMEM suplementado com 10% de SFB e 2% de antibiótico, (C+) células tratadas com DMSO 10%, (LED) expostas à irradiação por LED 660-690nm, (AICIPc) Ftalocianina de alumínio-cloro isolada, (Plur) Pluronic® F-127 isolado. Os resultados estão expressos em média da densidade óptica (D.O.) \pm desvio padrão. Foi utilizado teste ANOVA seguido pelo pós-teste e Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$. Fonte: Autoria própria, 2025.**

O sistema de entrega baseado em Pluronic F127 mostrou-se adequado como veículo, uma vez que não apresentou toxicidade significativa quando isolado, garantindo que os efeitos observados sejam atribuíveis especificamente à formulação AICIPc/F127 fotoativada.

4.2.1.3 Análise Dose-Resposta e Determinação do IC_{50}

A avaliação do efeito dose-dependente da formulação AICIPc/F127 revelou um padrão complexo de citotoxicidade. Os dados indicaram que, na ausência de luz, não houve alteração significativa da viabilidade celular em nenhuma das concentrações testadas (1-10 μ M), reforçando a segurança da formulação no escuro e a especificidade da ação fotodinâmica.

Quando ativada por luz LED, a formulação promoveu redução significativa da viabilidade celular ($p < 0,0001$) em todas as concentrações testadas (Figura 14).

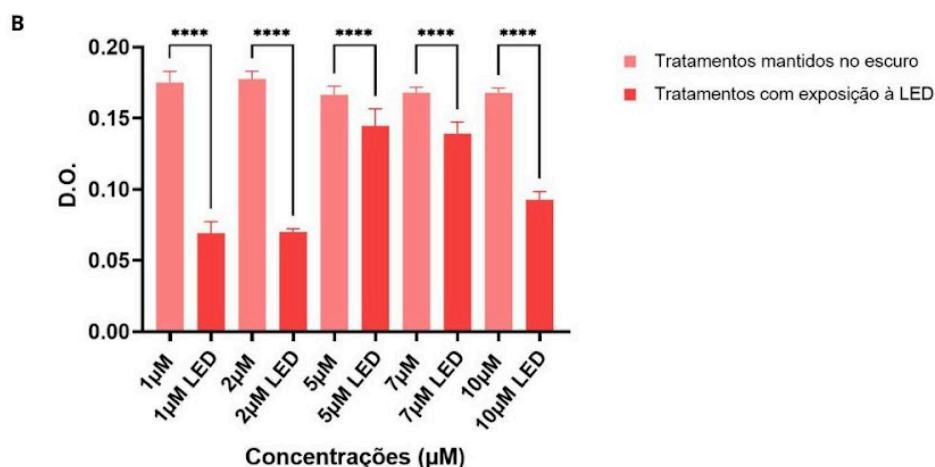


Figura 14 - Avaliação da viabilidade celular pelo ensaio de MTT em células MDA-MB-231. Os resultados estão expressos em média da densidade óptica (D.O.) \pm desvio padrão. Tratamentos com diferentes concentrações da formulação AICIPc-Pluronic® F-127 (1-10 μ M). Os resultados estão expressos em média da densidade óptica (D.O.) \pm desvio padrão. Foi utilizado teste ANOVA seguido pelo pós-teste e Tukey. * $p < 0,05$; ** $p < 0,0001$. Fonte: Autoria própria, 2025.**

Com os dados obtidos, foi realizada a construção da curva dose-resposta e ajuste por regressão não linear do tipo sigmoidal (modelo logístico de 4 parâmetros), permitindo a determinação do IC_{50} da formulação. O ajuste revelou os seguintes parâmetros: IC_{50} : 2,31 μ M, $\log IC_{50}$: 0,36, Top (viabilidade máxima estimada): 52,95%, Bottom (viabilidade mínima estimada): 29,25%, HillSlope: 30,78.

O valor de HillSlope elevado (30,78) indica uma transição bastante abrupta entre as concentrações mais eficazes e as menos eficazes, sugerindo uma faixa estreita de concentração para atuação ótima do fotossensibilizador (Figura 15).

Um aspecto notável dos resultados foi o perfil dose-resposta atípico observado, caracterizado por maior eficácia fotodinâmica nas concentrações mais baixas (1-2 μ M), com perda relativa de eficácia em concentrações superiores (5-7 μ M), embora ainda mantendo citotoxicidade significativa em 10 μ M. Este comportamento inversamente proporcional pode ser atribuído a múltiplos fatores como agregação molecular da AICIPc, um fenômeno bem documentado que reduz significativamente a eficácia fotodinâmica. Quando as moléculas de ftalocianina se agregam, ocorre supressão da fluorescência e diminuição da capacidade de geração de espécies reativas de oxigênio (ROS), particularmente oxigênio singlet, comprometendo a atividade citotóxica. Além dos próprios efeitos do microambiente celular, visto que o copolímero Pluronic F127 favorece a formação de um ambiente lipofílico que pode influenciar a distribuição e agregação da AICIPc em diferentes concentrações, afetando sua biodisponibilidade intracelular, e também devido a respostas adaptativas

celulares incluindo upregulation de sistemas antioxidantes endógenos, que poderiam atenuar parcialmente os efeitos da TFD.

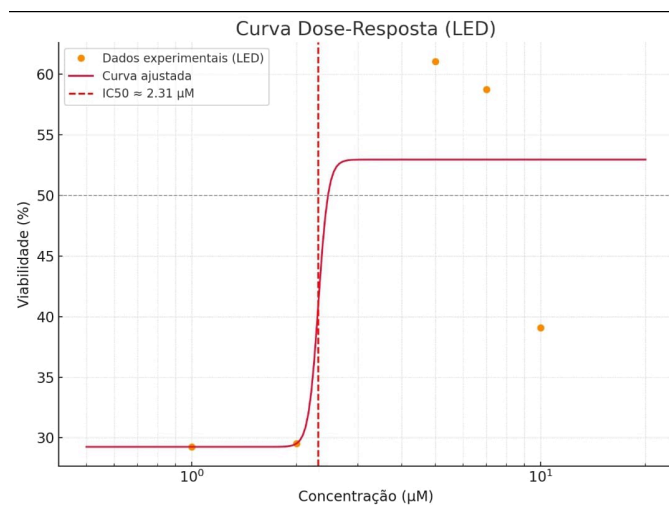


Figura 15 - Curva dose-resposta da formulação AICIPc/F127 após terapia fotodinâmica. Células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações da formulação AICIPc-Pluronic® F-127 (1, 2, 5, 7 e 10 µM) e expostas à irradiação LED (660-690nm). A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio MTT após 24h de tratamento. Os pontos laranja representam os dados experimentais obtidos e a linha contínua representa a curva ajustada por regressão não linear do tipo sigmoidal (modelo logístico de 4 parâmetros). A linha tracejada vermelha indica o IC₅₀ determinado (2,31 µM), correspondente à concentração que reduz 50% da viabilidade celular. A linha horizontal pontilhada cinza marca o valor de 50% de viabilidade para referência visual. Os dados representam a média de experimentos realizados em triplicata. O ajuste da curva revelou: IC₅₀ = 2,31 µM, Top = 52,95%, Bottom = 29,25%, HillSlope = 30,78. Fonte: Autoria própria, 2025.

O IC₅₀ determinado de 2,31 µM situa-se precisamente na faixa de maior eficácia observada, corroborando a adequação desta concentração para aplicações terapêuticas. Este valor é clinicamente relevante, pois concentrações baixas de fotossensibilizadores reduzem o risco de fotossensibilização sistêmica e efeitos adversos em tecidos saudáveis.

O câncer de mama triplo negativo representa um subtipo particularmente agressivo, caracterizado pela ausência de receptores de estrogênio, progesterona e HER2, limitando as opções terapêuticas direcionadas. Os resultados obtidos demonstram que a formulação AICIPc-F127 possui características essenciais para uma abordagem terapêutica segura e eficaz, como seletividade fotodinâmica, eficácia em baixas concentrações, pois o IC₅₀ de 2,31 µM indica alta potência da formulação, reduzindo potenciais efeitos sistêmicos e permitindo protocolos de tratamento com menores doses de fotossensibilizador, além de apresentar janela terapêutica favorável, onde concentrações eficazes para eliminação de células tumorais podem ser alcançadas sem comprometimento significativo de tecidos saudáveis adjacentes.

Além disso, os dados sugerem que há um pico ótimo de eficácia fotodinâmica nas concentrações mais baixas, indicando que protocolos clínicos devem priorizar o uso de concentrações próximas ao IC₅₀ para maximizar a eficácia terapêutica. O comportamento dose-resposta observado também indica a necessidade de inclusão de mais pontos intermediários (especialmente entre 2 e 5 µM) em estudos futuros para melhor definição da curva e maior robustez estatística na determinação de parâmetros farmacológicos.

Podemos considerar então que o perfil de resposta observado confirma a alta susceptibilidade das células MDA-MB-231 ao dano oxidativo induzido pela TFD com AICIPc-F127. Esta susceptibilidade está relacionada ao mecanismo clássico da terapia fotodinâmica, onde a excitação do fotossensibilizador pela luz leva à geração de espécies reativas de oxigênio, principalmente oxigênio singlet, responsáveis pela indução de morte celular por múltiplas vias, incluindo apoptose, necrose e autofagia. A eficácia observada pode estar relacionada às características metabólicas específicas das células tumorais de mama triplo negativo, incluindo alterações no sistema antioxidante endógeno, maior dependência de vias metabólicas geradoras de ROS e maior sensibilidade ao estresse oxidativo comparado a células normais.

4.2.1.4 Ensaio de Cristal Violeta

A análise dos controles revelou resultados consistentes com os achados do ensaio MTT. Os componentes isolados da formulação, ftalocianina de alumínio-cloro (AICIPc) e Pluronic F-127 (Plur), demonstraram comportamentos distintos quando mantidos no escuro versus expostos à irradiação LED. A AICIPc isolada no escuro apresentou densidade óptica elevada (aproximadamente 265), indicando ausência de toxicidade intrínseca e possível estímulo proliferativo, enquanto o Pluronic F127 isolado manteve densidade óptica similar ao controle (aproximadamente 230).

A exposição à irradiação LED promoveu reduções estatisticamente significativas ($p < 0,001$) na densidade óptica de todos os grupos tratados, confirmando a dependência luminosa para a atividade antiproliferativa. A AICIPc isolada apresentou redução de aproximadamente 265 para 20 unidades de D.O. após fotoativação, enquanto o Pluronic F127 reduziu de 230 para aproximadamente 100 unidades. Esta observação indica que ambos os componentes, quando isolados,

apresentam algum grau de fotossensibilidade, embora com intensidades diferentes (Figura 16).

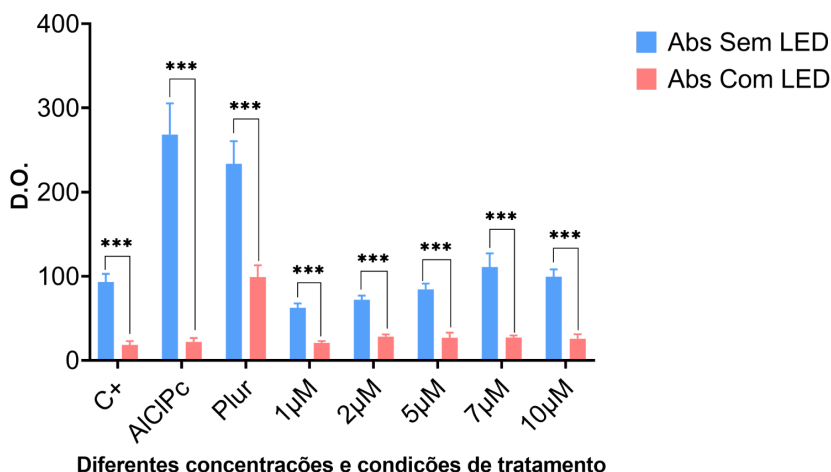


Figura 16 - Avaliação do efeito antiproliferativo da formulação AICIPc/F127 pelo ensaio de cristal violeta. Células MDA-MB-231 foram tratadas com diferentes concentrações da formulação AICIPc/F127 (1, 2, 5, 7 e 10 µM), ftalocianina de alumínio-cloro isolada (AICIPc) ou Pluronic F127 isolado (Plur), mantidas no escuro (barras azuis) ou expostas à irradiação LED 660-690nm (barras vermelhas). O controle positivo (C+) foi tratado com DMSO 10%. A densidade óptica (D.O.) foi mensurada após coloração com cristal violeta, sendo proporcional ao número de células aderidas viáveis. Os dados representam a média ± erro padrão de experimentos realizados em triplicata. ***p < 0,001 comparando tratamentos com e sem exposição à LED na mesma condição. Fonte: Autoria própria, 2025.

A avaliação das diferentes concentrações da formulação AICIPc/F127 revelou um padrão dose-resposta complexo, mas consistente com os achados do ensaio MTT. No escuro, todas as concentrações testadas (1-10 µM) mantiveram densidades ópticas relativamente elevadas, variando entre 65-115 unidades, demonstrando ausência de toxicidade significativa na ausência de irradiação.

Após fotoativação, observou-se redução drástica e uniforme da densidade óptica em todas as concentrações, com valores consistentemente baixos (15-30 unidades de D.O.), indicando severo comprometimento da capacidade de adesão e proliferação celular. Importante notar que, diferentemente do ensaio MTT, o cristal violeta não revelou o mesmo padrão de perda de eficácia em concentrações intermediárias, sugerindo que os mecanismos avaliados por cada método podem refletir aspectos distintos da citotoxicidade.

A convergência dos resultados entre os ensaios MTT e cristal violeta reforça a robustez dos achados e confirma a eficácia antiproliferativa da formulação AICIPc/F127. Enquanto o MTT avalia primariamente a atividade metabólica

mitocondrial, o cristal violeta quantifica células aderidas viáveis, proporcionando uma visão mais abrangente dos efeitos citotóxicos.

A redução uniforme observada no cristal violeta após fotoativação sugere que a TFD com AICIPc-F127 não apenas compromete a viabilidade metabólica (evidenciada pelo MTT), mas também afeta fundamentalmente a capacidade de adesão celular e integridade estrutural. Este efeito pode estar relacionado ao dano oxidativo em componentes da matriz extracelular, proteínas de adesão celular e citoesqueleto, resultante da geração de espécies reativas de oxigênio.

Este padrão é característico da terapia fotodinâmica eficaz, onde a geração de ROS afeta múltiplos alvos celulares simultaneamente, incluindo membranas celulares, organelas intracelulares, DNA e proteínas estruturais, levando à ativação de vias de morte celular por apoptose, necrose ou autofagia.

Do ponto de vista translacional, a confirmação da eficácia antiproliferativa por dois métodos independentes fortalece o potencial terapêutico da formulação AICIPc-F127. A capacidade de reduzir tanto a viabilidade metabólica quanto a capacidade proliferativa das células tumorais é essencial para uma terapia antineoplásica eficaz, pois previne não apenas a sobrevivência celular imediata, mas também a capacidade de recuperação e repopulação tumoral.

4.2.3 Morfologia celular

A análise morfológica revelou alterações morfológicas significativas nas células MDA-MB-231 após tratamento com AICIPc-Pluronic® F-127 com irradiação e em maiores concentrações (7-10 μM) mesmo sem irradiação (Figura 17). As células apresentaram retração citoplasmática, arredondamento, formação de bolhas na membrana e destacamento do substrato, características consistentes com morte celular por apoptose. Estas alterações foram evidentes 6 horas após a irradiação e tornaram-se mais pronunciadas após 24 horas. Em contraste, as células tratadas com a formulação no escuro mantiveram morfologia similar ao controle não tratado.

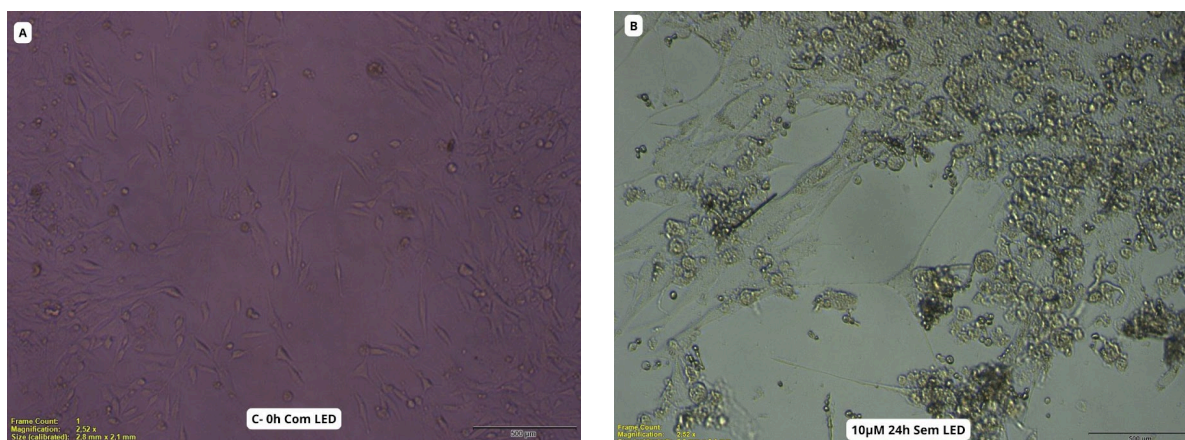


Figura 17 - Células da linhagem MDA-MB-231 em meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino e 2% de antibiótico sob exposição à luz de LED (660-690nm) (A). Alterações morfológicas da linhagem MDA-MB-231 após 24h de tratamento com o conjugado AICIPc+Pluronic® F-127 na concentração de 10 μ M, sem terapia fotodinâmica (B). Observa-se perda da morfologia fusiforme característica, com células arredondadas, encolhidas e presença de detritos celulares, indicando efeito citotóxico significativo do composto mesmo sem ativação por irradiação. Fonte: Autoria própria, 2025.

4.2.4 Efeitos na Capacidade Clonogênica

Os resultados do ensaio clonogênico demonstraram de forma inequívoca o potencial antiproliferativo da formulação AICIPc-Pluronic® F-127 quando submetida à terapia fotodinâmica. A análise da fração de sobrevivência revelou diferenças marcantes entre os tratamentos realizados na ausência e presença de irradiação LED, confirmando a especificidade da ação fotodinâmica e a segurança da formulação no escuro (Figura 18).

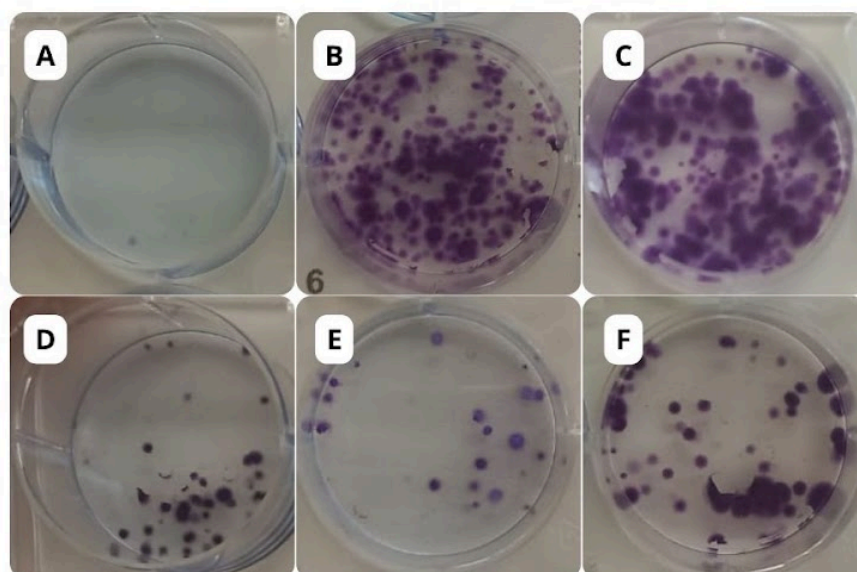


Figura 18 - Avaliação da capacidade clonogênica de células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações da formulação AICIPc-Pluronic® F-127 (1-10 μ M), sem ou com

irradiação (660-690 nm), por meio do ensaio de formação de colônias. (A) Grupo controle positivo: DMSO 10%; (B) Grupo controle negativo: DMEM completo; (C) Tratamento com formulação AICIPc-Pluronic® F-127 10 μM sem exposição à luz de LED; (D) Tratamento com formulação AICIPc-Pluronic® F-127 1 μM com fotoativação; (E) Tratamento com formulação AICIPc-Pluronic® F-127 2 μM com fotoativação; (F) AICIPc-Pluronic® F-127 10 μM com fotoativação. Fonte: Autoria própria, 2025.

Na ausência de irradiação, a formulação AICIPc-Pluronic® F-127 demonstrou perfil de segurança excepcional em todas as concentrações testadas (1-10 μM). A fração de sobrevivência manteve-se consistentemente elevada, variando entre 0,65 e 0,85 nas diferentes concentrações, valores que não diferem significativamente do controle negativo (C-: 0,90). Este comportamento confirma a ausência de toxicidade intrínseca da formulação e corrobora os achados dos ensaios de viabilidade celular previamente realizados (Figura 19).

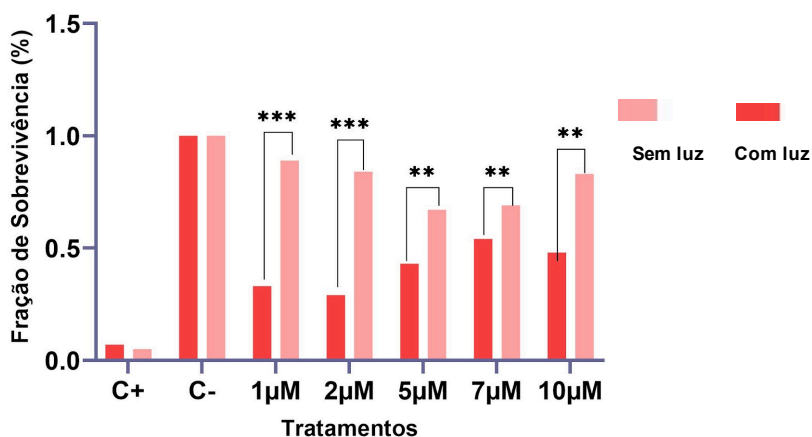


Figura 19 - Avaliação da capacidade clonogênica de células MDA-MB-231 tratadas com diferentes concentrações da formulação AICIPc-Pluronic® F-127 (1-10 μM), sem ou com irradiação (660-690 nm), por meio do ensaio de formação de colônias. A fração de sobrevivência celular foi calculada pela razão entre o número médio de colônias nos grupos tratados e o controle não tratado (sem luz). Os dados representam a média de três experimentos independentes realizados em triplicata. Fonte: Autoria própria, 2025.

Interessantemente, as concentrações de 1 μM e 10 μM apresentaram frações de sobrevivência ligeiramente superiores (0,85 e 0,82, respectivamente) comparadas às concentrações intermediárias, sugerindo possível efeito hormético em baixas doses ou saturação dos mecanismos celulares em concentrações elevadas. O controle positivo (C+) apresentou fração de sobrevivência extremamente baixa (0,05), validando a sensibilidade do ensaio e confirmando a eficácia do agente citotóxico utilizado como padrão.

Além disso, a fração de sobrevivência foi significativamente reduzida em todas as concentrações testadas, demonstrando eficácia citotóxica robusta quando a formulação é fotoativada.

A concentração de 1 μM apresentou fração de sobrevivência de 0,32, representando uma redução de aproximadamente 62% comparada ao mesmo tratamento no escuro. As concentrações de 2 μM e 5 μM mostraram eficácia ainda maior, com frações de sobrevivência de 0,28 e 0,26, respectivamente, indicando eliminação de aproximadamente 70-75% da capacidade clonogênica das células tumorais.

Surpreendentemente, as concentrações mais elevadas (7 μM e 10 μM) apresentaram frações de sobrevivência ligeiramente superiores (0,45 e 0,48, respectivamente) comparadas às concentrações intermediárias, reproduzindo o padrão dose-resposta atípico observado nos ensaios de viabilidade celular. Este comportamento pode ser atribuído aos mesmos mecanismos previamente discutidos, incluindo agregação molecular da AICIPc em concentrações elevadas, que compromete a eficiência de geração de espécies reativas de oxigênio.

A capacidade de formar colônias reflete não apenas a sobrevivência celular imediata, mas também a manutenção do potencial proliferativo em longo prazo. A redução significativa da fração de sobrevivência observada após a terapia fotodinâmica indica que a formulação AICIPc-Pluronic® F-127 não apenas induz morte celular aguda, mas também compromete irreversivelmente a capacidade de repopulação tumoral.

A convergência dos resultados do ensaio clonogênico com os achados dos ensaios de viabilidade celular (MTT e azul de trypan) e antiproliferativo (cristal violeta) fortalece significativamente a evidência científica sobre a eficácia da formulação desenvolvida. Enquanto os ensaios de viabilidade fornecem informações sobre a morte celular aguda, o ensaio clonogênico avalia consequências em longo prazo, oferecendo uma perspectiva mais abrangente sobre o potencial terapêutico.

A manutenção do padrão dose-resposta atípico entre as diferentes metodologias confirma que este comportamento é uma característica intrínseca da formulação, provavelmente relacionada às propriedades físico-químicas da AICIPc em diferentes concentrações. Esta consistência reforça a importância de utilizar concentrações próximas ao IC_{50} para maximizar a eficácia terapêutica.

Em síntese, os resultados do ensaio clonogênico demonstram que a formulação AICIPc-Pluronic® F-127 possui capacidade excepcional de suprimir o potencial clonogênico de células MDA-MB-231 quando submetida à terapia fotodinâmica, confirmando seu potencial como estratégia terapêutica eficaz para o câncer de mama triplo-negativo. A combinação de segurança no escuro e alta eficácia fotodinâmica posiciona esta formulação como uma opção terapêutica promissora, com potencial para contribuir significativamente no controle da progressão tumoral e prevenção de recidivas.

4.2.5 Efeitos na migração e invasão celular

O ensaio de cicatrização realizado com células MDA-MB-231 permitiu avaliar a influência da AICIPc, conjugada com o copolímero Pluronic® F-127, sobre a migração celular com e sem a TFD (Figura 20).

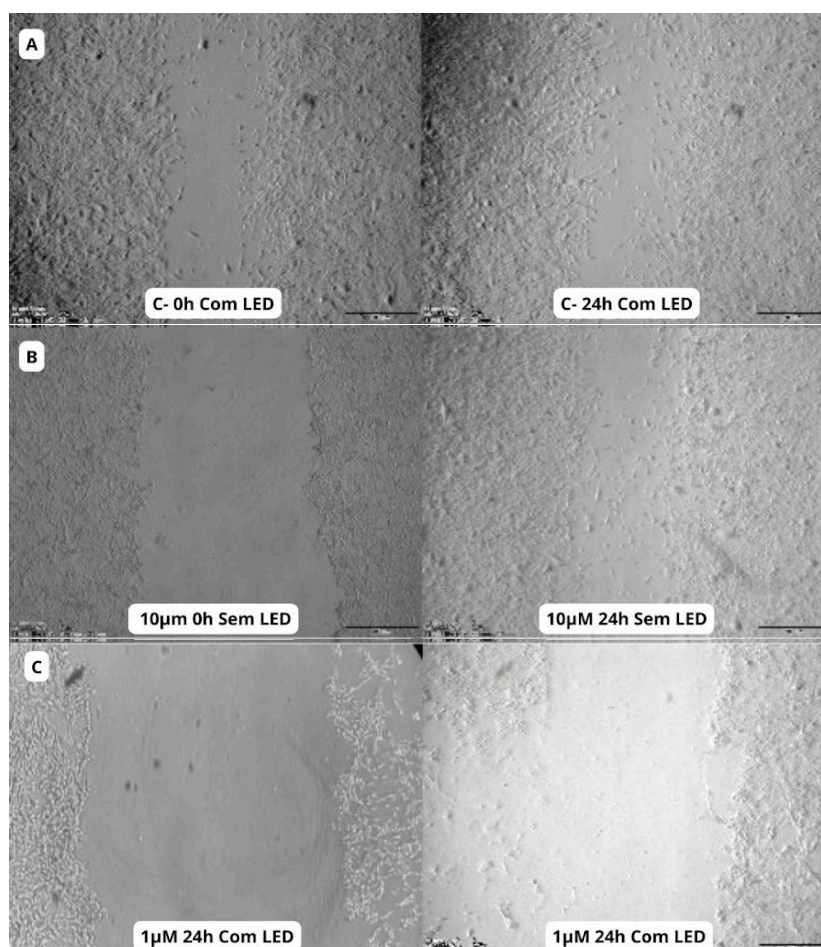
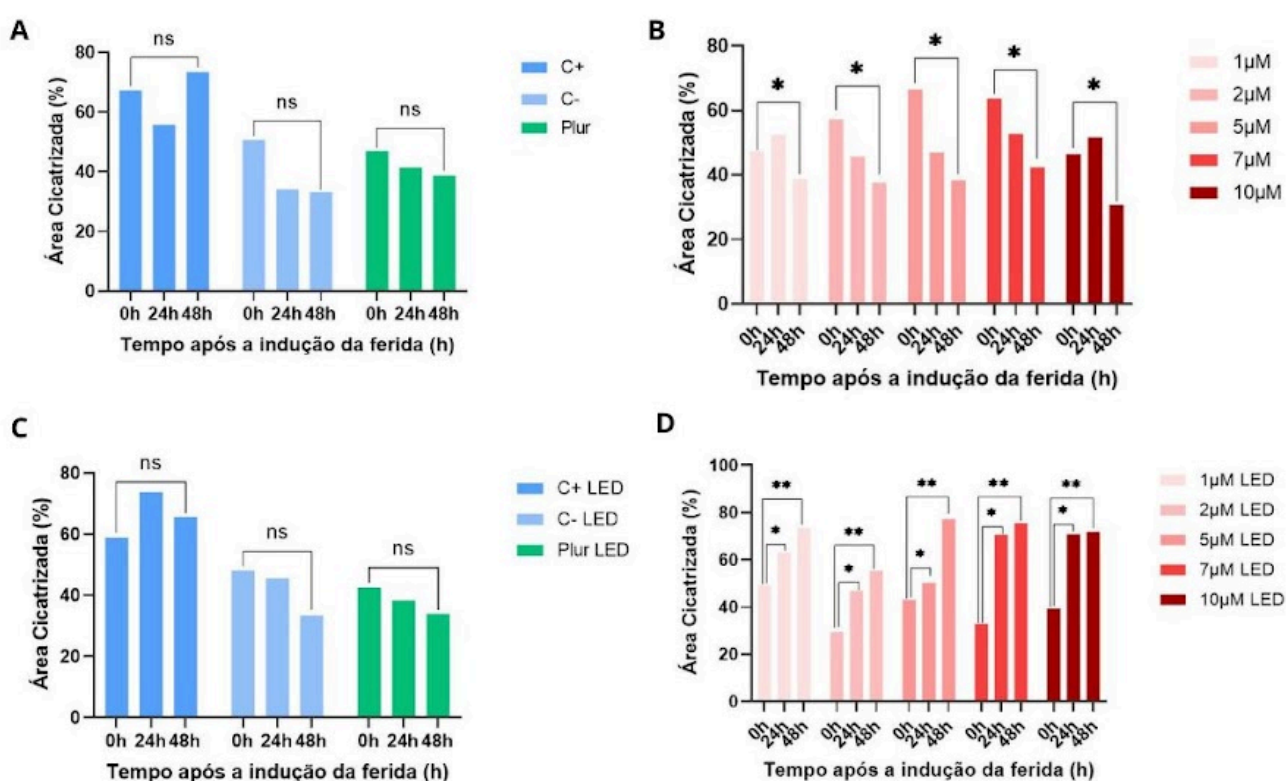


Figura 20 - Imagens representativas do ensaio de cicatrização em células MDA-MB-231, demonstrando a capacidade proliferativa no fechamento da “ferida” da linhagem no controle negativo (células em meio DMEM suplementado) mesmo expostas à luz de LED (660-690nm)

(A). Observa-se que essa característica se manteve mesmo sob tratamento com a maior concentração de trabalho do conjugado AICIPc+Pluronic® F-127(10 μ M), na ausência da ativação por terapia fotodinâmica (A). No entanto, o tratamento com a menor concentração de trabalho (10 μ M) foi capaz de reduzir significativamente o potencial proliferativo da linhagem (A). Fonte: Autoria própria, 2025.

Após 48 horas, pudemos observar que a área de fechamento da "ferida" nas células tratadas e sem exposição à luz de LED apresentou diminuição de 8,62%, 19,52%, 28,17%, 21,32% e 15,73% nas concentrações de 1 μ M, 2 μ M, 5 μ M, 7 μ M e 10 μ M respectivamente, considerando a área no momento 0h, indicando que as células, sem a terapia fotodinâmica, continuaram a expandir e reduzir a a area do risco (Figura 21 B).



Além disso, o ensaio mostrou uma redução significativa (p < 0,01) na capacidade invasiva das células após TFD com AICIPc-Pluronic® F-127 (Figura 21D).

O número de células invasoras foi reduzido em aproximadamente 13,89%, 17,46%, 7,26%, 37,75%, 31,42% nas primeiras 24h e 24,29%, 25,93%, 34,16%, 42,58% e 32,49% nas respectivas concentrações após 48h de tratamento em comparação com o controle negativo, que sob as mesmas condições apresentou taxa de fechamento de ferida de +14,64%, evidenciando o potencial da TFD em reduzir não apenas a viabilidade, mas também a agressividade das células de câncer de mama triplo-negativo.

Quanto ao Pluronic® F-127 utilizado isoladamente, foi possível observar que a taxa de crescimento celular se mostrou crescente e padronizada com ou sem exposição à luz de LED após 24 e 48h de tratamento. Sendo então importante considerar que, embora classificado como um excipiente inerte em baixas concentrações, o F-127 pode alterar a fluidez de membranas lipídicas, modular a atividade de proteínas de transporte e até potencializar efeitos de drogas associadas, especialmente em células tumorais. Dessa forma, a presença do copolímero na formulação pode aumentar a internalização da AICIPc, contribuindo para sua toxicidade.

Portanto, os resultados obtidos neste experimento reforçam a capacidade da AICIPc-F127 em inibir a migração de células do subtipo triplo-negativo de câncer de mama (MDA-MB-231), indicando seu potencial citotóxico intrínseco da formulação. Esses achados justificam investigações futuras quanto aos mecanismos moleculares envolvidos nesse efeito e reforçam o potencial da AICIPc-F127 como plataforma versátil no tratamento de cânceres agressivos.

4.2.6 Avaliação do tipo de morte celular

A avaliação da morte celular por citometria de fluxo utilizando coloração com Anexina V-FITC/PI permitiu a distinção entre células viáveis, em apoptose precoce, apoptose tardia/necrose e necrose isolada após os diferentes tratamentos aplicados à linhagem MDA-MB-231 (Figura 22).

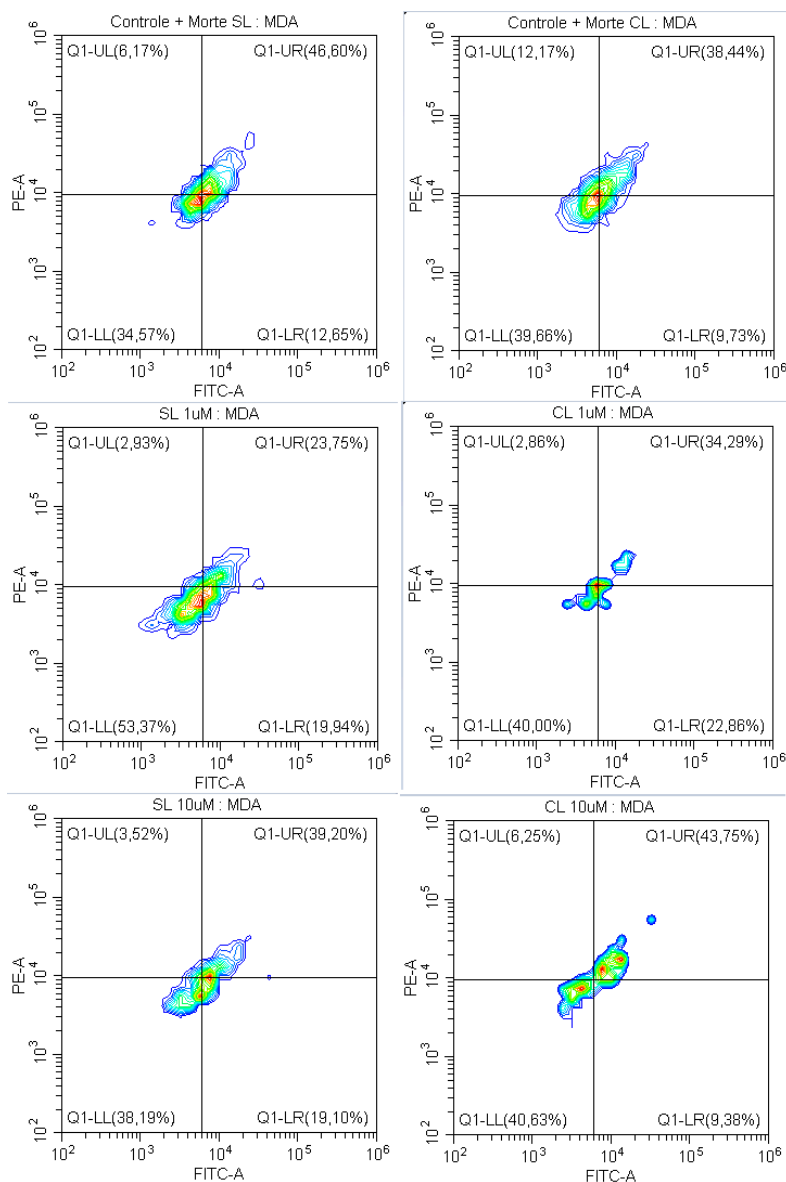


Figura 22 - Análise da morte celular por citometria de fluxo utilizando coloração com Anexina V-FITC e iodeto de propídio (PI) em células MDA-MB-231. Os gráficos representam a distribuição celular entre os quadrantes: Q3 (Células viáveis - Anexina V-/PI-), Q4 (apoptose precoce - Anexina V+/PI-), Q2 (apoptose tardia/necrose secundária - Anexina V+/PI+) e Q1 (necrose - Anexina V-/PI+), Foram analisados os seguintes grupos experimentais: (A) Controle positivo sem irradiação, (B) Controle positivo com irradiação LED (660-690nm), (C) tratamento com 1 μ M de AICIPc+Pluronic® F-127 sem LED, (D) tratamento com 1 μ M de AICIPc+Pluronic® F-127 com LED, (E) tratamento com 10 μ M de AICIPc+Pluronic® F-127 sem LED e (F) tratamento com 10 μ M de AICIPc+Pluronic® F-127 com LED. Fonte: Autoria própria, 2025.

Os grupos de controle positivo (sem e com luz LED) apresentaram viabilidade celular <40%, com taxas mais altas de apoptose, o que indica que a exposição à luz por si só não induziu morte celular diferencial.

No tratamento com 1 μ M do conjugado AICIPc + Pluronic® F-127 sem luz, observou-se uma redução expressiva da viabilidade celular (53,37%) e aumento

significativo da apoptose (19,94% precoce e 23,75% tardia), sugerindo que o composto possui atividade citotóxica mesmo na ausência de ativação por luz. Com a ativação por luz LED, esse mesmo tratamento promoveu ainda maior morte celular (60%), com acúmulo de células em apoptose tardia (34,29%) e precoce (22,86%), evidenciando o efeito fotodinâmico do sistema.

No tratamento com 10 μM , o perfil de morte celular também foi alterado. Sem luz, a viabilidade celular caiu para 38,19%, com aumento acentuado de apoptose tardia (39,20%). Com luz, a porcentagem de células viáveis permaneceu semelhante (40,63%), mas houve um aumento importante na necrose isolada (6,25%) e apoptose tardia (43,75%), indicando que em concentrações mais altas, a ativação fotodinâmica pode induzir formas mais agressivas de morte celular, possivelmente relacionadas à necrose secundária.

Em conjunto, os dados demonstram que o conjugado AICIPc + Pluronic® F-127 apresenta atividade citotóxica relevante na linhagem MDA-MB-231, potencializada pela exposição à luz. O padrão de morte celular indica predominância de apoptose nos tratamentos com 1 μM , enquanto o aumento da necrose observado em 10 μM sob luz pode sugerir uma transição entre mecanismos apoptóticos e necróticos conforme a dose e intensidade da ativação fotodinâmica.

5 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou de forma convincente o potencial terapêutico da formulação nanotecnológica AICIPc-Pluronic® F-127 como uma estratégia inovadora para o tratamento do câncer de mama triplo-negativo através da terapia fotodinâmica. Os resultados obtidos revelam que a incorporação da ftalocianina de alumínio-cloro em micelas de Pluronic® F-127 não apenas preserva as propriedades fotofísicas essenciais do fotossensibilizador, mas também confere características físico-químicas favoráveis para aplicação biomédica.

A caracterização físico-química da formulação revelou um sistema coloidal estável, com diâmetro hidrodinâmico médio de 329,6nm, posicionando-se favoravelmente na janela terapêutica ideal para aproveitamento do efeito de permeabilidade e retenção aumentada (EPR) característico de tecidos tumorais. O potencial zeta de -19,8 mV proporcionou estabilização eletrostática adequada, enquanto a arquitetura molecular do copolímero tribloco conferiu estabilização estérica adicional, resultando em um sistema que equilibra estabilidade coloidal com capacidade de interação celular. A análise por FTIR confirmou a preservação da integridade estrutural de todos os componentes da formulação, enquanto a difração de raios X evidenciou a manutenção da estrutura cristalina parcial da AICIPc, fundamental para suas propriedades fotofísicas.

Os estudos in vitro em células MDA-MB-231 demonstraram a eficácia citotóxica excepcional da formulação quando submetida à terapia fotodinâmica. O valor de IC_{50} determinado de 2,31 μ M representa uma concentração clinicamente relevante, oferecendo alta potência terapêutica com reduzido potencial de toxicidade sistêmica. Particularmente notável foi a confirmação da segurança da formulação na ausência de irradiação, com viabilidade celular mantida acima de 90% em todas as concentrações testadas, confirmando a especificidade da ação fotodinâmica e eliminando preocupações sobre toxicidade no escuro.

A análise dos mecanismos de morte celular revelou que a formulação AICIPc-Pluronic® F-127 induz predominantemente apoptose em concentrações baixas, transitando para mecanismos necróticos em concentrações mais elevadas quando fotoativada. Este perfil dose-dependente sugere versatilidade terapêutica, permitindo modulação dos mecanismos citotóxicos conforme as necessidades

clínicas. A avaliação morfológica confirmou as alterações celulares características de morte celular programada, incluindo retração citoplasmática, arredondamento celular e formação de corpos apoptóticos.

Um aspecto particularmente relevante dos resultados foi a demonstração de que concentrações mais baixas de AICIPc (1-2 μ M) apresentaram maior eficácia fotodinâmica comparativamente a concentrações intermediárias, fenômeno atribuível à prevenção de agregação molecular que compromete a geração de espécies reativas de oxigênio. Esta observação possui implicações clínicas importantes, sugerindo que protocolos terapêuticos otimizados devem priorizar concentrações próximas ao IC₅₀ para maximizar a eficácia terapêutica.

A convergência dos resultados obtidos através de múltiplas metodologias analíticas - ensaios de viabilidade celular (azul de trypan e MTT), avaliação antiproliferativa (cristal violeta), análise morfológica e caracterização do tipo de morte celular - confere robustez científica aos achados e demonstra que a formulação desenvolvida atua através de mecanismos multifacetados, comprometendo simultaneamente a viabilidade metabólica, capacidade de adesão e potencial proliferativo das células tumorais.

Do ponto de vista translacional, os resultados apresentados estabelecem uma base científica sólida para o desenvolvimento de uma modalidade terapêutica complementar ou alternativa para o câncer de mama triplo-negativo, subtipo caracterizado por limitadas opções terapêuticas e prognóstico desfavorável. A formulação AICIPc-Pluronic® F-127 demonstra características essenciais para uma terapia antineoplásica eficaz: alta seletividade fotodinâmica, eficácia em baixas concentrações, perfil de segurança favorável e janela terapêutica ampla.

Embora os resultados *in vitro* sejam promissores, reconhece-se a necessidade de validação em modelos experimentais mais complexos, incluindo estudos em modelos tridimensionais de cultura celular, avaliações de biodistribuição e farmacocinética, bem como ensaios pré-clínicos em modelos animais para confirmação da eficácia e segurança antes da translação para aplicações clínicas.

Em síntese, este trabalho demonstra que a nanotecnologia, através do desenvolvimento de sistemas de entrega baseados em copolímeros anfífilos, representa uma abordagem promissora para superar as limitações da terapia fotodinâmica convencional. A formulação AICIPc-Pluronic® F-127 desenvolvida oferece uma combinação única de estabilidade físico-química, biocompatibilidade e

eficácia citotóxica seletiva, posicionando-se como uma ferramenta terapêutica inovadora com potencial para contribuir significativamente no arsenal terapêutico contra o câncer de mama triplo-negativo.

Os achados apresentados não apenas avançam o conhecimento científico na interface entre nanotecnologia e oncologia, mas também abrem perspectivas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas personalizadas e menos invasivas, alinhadas com os princípios da medicina de precisão e com o potencial de melhorar significativamente o prognóstico e a qualidade de vida de pacientes acometidas por esta forma agressiva de câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, T., *et al.* Nanoparticles in Drug Delivery Systems: Challenges, Innovations, And Surface Modification for Targeted Therapeutics. **Indus Journal of Bioscience Research**, vol. 3(1), p. 325–336, 2025.

Abdi, H. & Williams, L. J. Tukey's honestly significant difference (HSD) test. In: SALKIND, N. (Ed.). **Encyclopedia of Research Design**. Thousand Oaks, CA: Sage, p. 1-5, 2010.

Abrahamse, H. & Hamblin, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347-364, 2016.

Agostinis, P., *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin.** vol. 61(4), pag. 250-81, 2011.

Alexandridis, P., Nivaggioli, T., & Hatton, T. A. Temperature Effects on Structural Properties of Pluronic P104 and F108 PEO-PPO-PEO Block Copolymer Solutions. **Langmuir**, Vol. 11, pág.1468-1476, 1995.

Alibolandi, M. *et al.* Curcumin-entrapped MePEG-PCL micelles as a drug delivery system: Preparation, characterization and cytotoxicity. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 10, p. 1-16, 2015.

Azizi, M. *et al.* Multifunctional nanostructures: Intelligent design to overcome biological barriers. **Materials Today Bio**, Vol. 20, ISSN 2590-0064, 2023.

Barboza, L. M., *et al.* Estudo Sobre a Espectroscopia da Hipericina. **Revista Processos Químicos**, Vol. 12, pág. 123-125, 2018.

Batrakova E. V. & Kabanov A.V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. **J Control Release**. Vol. 130(2), pág. 98-106, 2008.

Beaucage, G. **Polymer Analysis - X-ray Diffraction**. University of Cincinnati, 2023. Disponível em: <https://www.eng.uc.edu/~beaucag/Classes/Analysis/Chapter7.html>. Acesso em: 31 mai. 2025.

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

Bianchini, G., *et al.* Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nat. Rev. Clin. Oncol.** Vol. 13 (11), pag. 674-690, 2016.

Borzęcka, W., Domiński, A. & Kowalczyk, M. Recent Progress in Phthalocyanine-Polymeric Nanoparticle Delivery Systems for Cancer Photodynamic Therapy. **Nanomaterials**. 2021; Vol. 11(9), pág. :2426, 2021.

Cabana, A., *et al.* Study of the gel-sol transition of poloxamer 407 by differential scanning calorimetry and rheology. **Pharmaceutical Research**, v. 14, n. 10, p. 1259-1266, 1997.

Cangussu, L. M. B., *et al.* Photodynamic therapy mediated by nanoparticles Aluminum Chloro Phthalocyanine in oral squamous carcinoma cells. **Lasers Med. Sci.** Vol. 37, pag. 2509-2516, 2022.

Cardoso, R. L., *et al.* Percepção de mulheres com câncer de mama sobre o cuidado integral fisioterapêutico. **Research, Society and Development**, Vol. 11, núm. 17, ed. 256111737705, 2022.

Castano, A. P., *et al.* Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitizers. Photochemistry and cellular localization. **Photodiagn Photodyn Ther.** Vol. 1(4), Pag. 279–293, 2004.

Castano, A. P., Mroz, P. & Hamblin, M. Photodynamic therapy and tumor immunity. **Nature Reviews Cancer.** Vol. 6, pag. 535-45, 2006.

Castro, K. C., *et al.* Pluronic(R) triblock copolymer-based nanoformulations for cancer therapy: a 10-year overview. **J. Control. Release**, Vol. 353, pag. 802-822, 2023.

Chabner, B. A. & Longo, D. L. (Orgs). **Manual de Oncologia de Harrison.** 2. ed. Porto Alegre: AMGH, p. 1-7, 2015.

Chen, D., *et al.* Nanoparticle drug delivery systems for synergistic delivery of tumor therapy. **Frontiers in Pharmacology**, 14, 1111991, 2023.

Cohen, S. Y. *et al.* Modifiable risk factors in women at high risk of breast cancer: a systematic review. **Breast Cancer Research**, London, v. 25, n. 45, p. 1-23, 24 abr. 2023.

Crowley, L. C. *et al.* Measuring cell death by propidium iodide uptake and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 7, pdb.prot087163, 2016.

Danaei, M. *et al.* Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

Dang, Y. & Guan, J. Nanoparticle-based drug delivery systems for cancer therapy. **Smart Mater Med.** Vol. 1, pág. 10-19, 2020.

Debien, V., *et al.* Immunotherapy in breast cancer: An overview of current strategies and perspectives. **Npj Breast Cancer**, Vol. 9(1), pag. 1-10., 2023.

Dent, R., *et al.* Triple-negative breast cancer: A review of the literature. **Clinical Breast Cancer.** Vol. 7(6), pág. 415-420, 2007.

De Silva, P., *et al.* Photodynamic therapy, priming and optical imaging: Potential co-conspirators in treatment design and optimization — a Thomas Dougherty Award for

Excellence in PDT paper. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. Vol. 24, N. 11, pág. 1320-1360, 2020.

Dolmans, D. E., *et al.* Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, Vol. 3(5), pág. 390-400, 2003.

Elsabahy, M. & Wooley, K. L. Design of polymeric nanoparticles for biomedical delivery applications. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 7, p. 2545-2561, 2012.

Elumalai K., *et al.* Review of the efficacy of nanoparticle-based drug delivery systems for cancer treatment. **Biomedical Technology**, vol. 5, 2024.

Feoktistova, M., Geserick, P. & Leverkus, M. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. **Cold Spring Harbor Protocols**, v. 2016, n. 4, pdb.prot087379, 2016.

Figueiras, A., *et al.* New Advances in Biomedical Application of Polymeric Micelles. **Pharmaceutics**. Vol. 14, pág. 1700, 2022.

Filho, P. N., *et al.* Immune Checkpoint Inhibitors in Breast Cancer: A Narrative Review. **Oncology and Therapy**, vol. 11(2), pag. 171, 2023.

Foulkes, W. D., *et al.* Triple-negative breast cancer: a review of the literature. **Clinical Breast Cancer**, Vol. 10(1), pág. 1-11, 2010.

Franken, N. A. P. *et al.* Clonogenic assay of cells in vitro. **Nature Protocols**, v. 1, n. 5, p. 2315-2319, 2006.

Freshney, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications**. 6th ed. Hoboken: John Wiley & Sons, 2010.

Gao, Y., *et al.* Patterns of distant metastases in patients with triple-negative breast cancer—A population-based study. **Precision Medical Sciences**, Vol. 12(3), P. 182-195. 2023.

Garrido-Castro A. C., *et al.* Insights into Molecular Classifications of Triple-Negative Breast Cancer: Improving Patient Selection for Treatment. **Cancer Discov**. Vol. 9(2), pág. 176-198, 2019.

Giordano, E. **The infrared absorption of phthalocyanine and its complexes**. Oregon State University, 2005.

Glantz, S. A. & Slinker, B. K. **Primer of applied regression and analysis of variance**. 2nd ed. New York: McGraw-Hill Medical Publishing Division, 2001.

Goldhirsch A., *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. **Ann Oncol**. Vol. ;24(9), pág. 2206-23, 2013.

Goto, P. L., *et al.* Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. **Int J Pharm**, Vol. 518, pág 228-241, 2017.

Gurcan G., *et al.* Photodynamic Therapy for the Treatment and Diagnosis of Cancer—A Review of the Current Clinical Status. **Frontiers in Chemistry**. Vol. 9. ISSN=2296-2646. 2021.

Harbeck, N., *et al.* Breast cancer. **Nat Rev Dis Primers**, Vol. 5, núm. 66, 404p, 2019. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>>.

Holliday, D. L. & Speirs, V. Choosing the right cell line for breast cancer research. **Breast Cancer Research**, v. 13, n. 4, p. 215, 2011.

Honary, S. & Zahir, F. Effect of zeta potential on the properties of nano-drug delivery systems - A review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, p. 265-273, 2013.

Huble, E. *et al.* Cryopreservation of mammalian cell cultures. **BioFiles**, v. 9, n. 9, p. 18-20, 2014.

Jenkins, R. & Snyder, R. L. **Introduction to X-ray powder diffractometry**. New York: John Wiley & Sons, 1996.

Jiang, Y. C., *et al.* Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, Cambridge, v. 186, n. 8, p. 1708-1728, 13 abr. 2023. DOI: 10.1016/j.cell.2023.01.040.

Jin H., *et al.* Insight into the Crosstalk between Photodynamic Therapy and Immunotherapy in Breast Cancer. **Cancers**, 15(5):1532, 2023.

Jonkman, J. E. N. *et al.* An introduction to the wound healing assay using live-cell microscopy. **Cell Adhesion & Migration**, v. 8, n. 5, p. 440-451, 2014.

Josefen, L. B. & Boyle, R. W. Photodynamic therapy and the development of metal-based photosensitisers. **Metal-Based Drugs**, New York, v. 2008, p. 1-23, 2008.

Kabanov, A. V., *et al.* Pluronic block copolymers in drug delivery: The role of micellization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, Vol. 54(2), pág. 245-258, 2002.

Khan, S. A., *et al.* Early Local Therapy for the Primary Site in De Novo Stage IV Breast Cancer: Results of a Randomized Clinical Trial. **JCO**, Vol. 40, pág. 978-987, 2022.

Kwiatkowski, S., *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Vol. 106, pag. 1098-1107, 2018.

Kwiatkowski, S., *et al.* Photodynamic therapy: Mechanisms and clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, Vol. 23, pág. 1-10, 2018.

Kumar, A., *et al.* FTIR, TGA and DC electrical conductivity studies of phthalocyanine and its complexes. **Synthetic Metals**, v. 157, n. 22-23, p. 905-909, 2005.

Kumar, A. *et al.* X-ray diffraction analysis of photosensitizer-loaded nanocarriers: Structural insights for drug delivery optimization. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 642, p. 123145, 2024

Lehmann, B. D. *et al.* Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **Journal of Clinical Investigation**, Vol. 121, núm. 7, pág. 2750-2767, 2016.

Liang, C. C., *et al.* In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. **Nature Protocols**, v. 2, n. 2, p. 329-333, 2007.

Longo, J. P. F., *et al.* Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, Amsterdam, v. 94, n. 2, p. 143-146, fev. 2009. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2008.11.003.

Longo, J. P. F., *et al.* Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study. **Lasers in Medical Science**, London, v. 30, n. 2, p. 549-559, fev. 2015. DOI: 10.1007/s10103-013-1369-3.

Maeda, H. *et al.* The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors: Improvement of tumor uptake, lowering of systemic toxicity, and distinct tumor imaging in vivo. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 71-79, 2013.

Mandal, S. D., *et al.* Current challenges and future directions in nanomedicine. In: SINGH, Ram Lakhan; MONDAL, Ankur (ed.). **Nanotechnology in medicine and biology**. Cham: Springer, p. 679-698, 2021. DOI: 10.1007/978-3-030-50703-9_27.

Mansoori, B., *et al.* Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, Vol. 26, pág. 395-404, 2019.

Mathlouthi, M. & Koenig, J. L. Vibrational spectra of carbohydrates. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 44, p. 7-89, 1987.

Martinez, J., *et al.* Nanoparticle characterization parameters for biomedical applications: A comprehensive review. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 189, p. 114923, 2023.

Miretti, M., *et al.* Current phthalocyanines delivery systems in photodynamic therapy: an updated review. **Curr Med Chem**, Vol. 28 (26), pág. 5339-5376, 2021.

Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

Muehlmann, L. A., *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers

and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **J Nanobiotechnol.**, Vol. 13, Núm. 36, 2015.

Mundekkad, D. & Cho, W.C. Nanoparticles in Clinical Translation for Cancer Therapy. **International Journal of Molecular Sciences**, Vol. 23, pág. 1685, 2022.

Nolan, E., *et al.* Deciphering breast cancer: from biology to the clinic. **Cell**, Vol. 186, Núm. 8, Pág. 1708--1728, 2023.

Oehler, J. B., Rajapaksha, W., & Albrecht, H. Emerging Applications of Nanoparticles in the Diagnosis and Treatment of Breast Cancer. **Journal of Personalized Medicine**, 14(7), 723, 2024.

Ogunsipe, A., *et al.* Solvent effects on the photochemical and fluorescence properties of zinc phthalocyanine derivatives. **Journal of Molecular Structure**, v. 650, n. 1-3, p. 131-140, 2003.

Oliveira, C., *et al.* Photophysical properties preservation in encapsulated photosensitizers for PDT applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103456, 2023.

Oliveira, K. A., *et al.* The complex nature of heterogeneity and its roles in breast cancer biology and therapeutic responsiveness. **Front Endocrinol (Lausanne)**, Vol. 23, pág. 14, 2023.

Oualla, K., *et al.* Novel therapeutic strategies in the treatment of triple-negative breast cancer. **Therapeutic Advances in Medical Oncology**, Vol. 9(7), p. 493. 2017.

Pallavi, P., *et al.* Nanoformulation of Tetrapyrroles Derivatives in Photodynamic Therapy: A Focus on Bacteriochlorin, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Vol. 3011918, 12 pag., 2022.

Patel, R. & SINGH, K. Zeta potential effects on cellular uptake and drug release kinetics in cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 195, p. 45-58, 2024.

Perou, C. M., *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 17 ago. 2000. DOI: 10.1038/35021093. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/35021093>. Acesso em: 25 mai. 2025.

Phelan, M. C., May, K. M. Basic techniques in mammalian cell tissue culture. **Current Protocols in Cell Biology**, v. 66, p. 1.1.1-1.1.22, 2015.

Pitto-Barry, A. & Barry, N. P. E. Pluronic® block-copolymers in medicine: from chemical and biological versatility to rationalisation and clinical advances. **Polym. Chem.**, Vol. 5, núm. 10, pag. 3291-3297, 2014.

Pourbakhsh, M., *et al.* Poloxamer-based drug delivery systems: Frontiers for treatment of solid tumors. **Materials Today Bio**, Vol. 32, ISSN 2590-0064, 2025.

Rafehi, H. *et al.* Clonogenic assay: adherent cells. **Journal of Visualized Experiments**, n. 49, e2573, 2011.

Riccardi, C. & Nicoletti, I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. **Nature Protocols**, v. 1, n. 3, p. 1458-1461, 2006.

Rochas, C., *et al.* Sulfate content of carrageenan and agar determined by infrared spectroscopy. **Botanica Marina**, v. 29, n. 4, p. 335-340, 1986.

Rodriguez, M., *et al.* Surface charge optimization for enhanced tumor cell targeting in nanomedicine. **Biomaterials**, v. 298, p. 122134, 2024.

Sahay, G., *et al.* Endocytosis of nanomedicines. **Journal of Controlled Release**, v. 145, n. 3, p. 182-195, 2010.

Samanthula, K. S., *et al.* Solid Lipid Nanoparticles for the Delivery of Plant-derived Bioactive Compounds in the Treatment of Cancer Disorders – A Review. **Journal of Natural Remedies**, Vol. 24(7), pag. 1445–1465, 2024.

Schneider, C. A., Rasband, W. S., Eliceiri, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nature Methods**, v. 9, n. 7, p. 671-675, 2012.

Sebaugh, J. L. Guidelines for accurate EC50/IC50 estimation. **Pharmaceutical Statistics**, v. 10, n. 2, p. 128-134, 2011.

Silva, B. M., *et al.* Zeta potential optimization in nanomedicine: A comprehensive approach for enhanced therapeutic efficacy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 196, p. 114789, 2024.

Silva, L. C., *et al.* Receptor hormonal negativo como fator preditivo para resposta patológica completa ao tratamento neoadjuvante de câncer de mama. **Einstein (São Paulo)**, Vol. 17, 2019.

Souza, A. C., *et al.* Necroptosis as a consequence of photodynamic therapy in tumor cells. **Lasers Med Sci**. Vol. 39, pág. 267, 2024.

Strober, W. Trypan blue exclusion test of cell viability. **Current Protocols in Immunology**, v. 111, p. A3.B.1-A3.B.3, 2015.

Stuart, B. H. **Infrared spectroscopy: fundamentals and applications**. Chichester: John Wiley & Sons, 2004.

Sung, H., *et al.* Global cancer statistics 2020: Global cancer burden in 2020. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, Vol. 71, pág. 209-249, 2021.

Synytsya, A. & Novak, M. Structural analysis of glucans. **Annals of Translational Medicine**, v. 2, n. 2, p. 17, 2013.

Van Meerloo, J., Kaspers, G. J. L., Cloos, J. Cell sensitivity assays: the MTT assay. In: CREE, I. A. (Ed.). **Cancer cell culture: methods and protocols**. Totowa: Humana Press, 2011. p. 237-245.

Waks, A. G. & Winer, E. P. Breast cancer treatment: a review. **JAMA**, Chicago, v. 321, n. 3, p. 288-300, 15 jan. 2019. DOI: 10.1001/jama.2018.19323. Disponível em: <https://jamanetwork.com/journals/jama/fullarticle/2721185>. Acesso em: 25 mai. 2025.

Wang, J. & Wu, G. Breast Cancer: An Overview of Current Therapeutic Strategies, Challenge, and Perspectives. **Breast Cancer : Targets and Therapy**, Vol. 15, p. 721. 2023.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **WHO launches new roadmap on breast cancer**. Geneva: WHO, 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news/item/03-02-2023-who-launches-new-roadmap-on-breast-cancer>. Acesso em: 25 jul. 2025.

Xu, J., *et al.* Applications and challenges of ultra-small particle size nanoparticles in tumor therapy. **Journal of Controlled Release**, Vol. 353, 2023.

Yao, Y., *et al.* Nanoparticle-Based Drug Delivery in Cancer Therapy and Its Role in Overcoming Drug Resistance. **Frontiers in Molecular Biosciences**, Vol. 7, 558493, 2020.

Yolanda, S. *et al.* Colloidal stability of triblock copolymer micelles in biological media: Mechanisms and applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 218, p. 112756, 2022.

Younus, L. A., *et al.*, Photodynamic therapy in cancer treatment: properties and applications in nanoparticles. **Brazilian Journal of Biology**, Vol. 84, Ed. 268892, 2024.

Zhang, Y., *et al.* EPR effect optimization in nanoparticle-based cancer therapy: Current strategies and future perspectives. **Advanced Healthcare Materials**, v. 12, p. 2201847, 2023.