

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE FÍSICA DE SÃO CARLOS

Gabriel Oliveira Jasinevicius

Estudo das propriedades ópticas e térmicas de uma nanoemulsão de
indocianina verde e suas aplicações

São Carlos
2022

GABRIEL OLIVEIRA JASINEVICIUS

Estudo das propriedades ópticas e térmicas de uma nanoemulsão de indocianina verde e suas aplicações

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Física do Instituto de Física de São Carlos da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Física Aplicada
Opção: Física Biomolecular
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Hilde Harb Buzzá

Versão Corrigida
(versão original disponível na Unidade que aloja o Programa)

São Carlos
2022

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Jasinevicius, Gabriel

Estudo das propriedades ópticas e térmicas de uma nanoemulsão de indocianina verde e suas aplicações / Gabriel Jasinevicius; orientadora Hilde Buzzá - versão corrigida -- São Carlos, 2022.

141 p.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Física Biomolecular) -- Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Indocianina verde. 2. Terapia fototérmica. 3. Nanoemulsão. 4. Nanotecnologia. 5. Melanoma. I. Buzzá, Hilde, orient. II. Título.

Dedico aos meus pais pelo esforço, dedicação e boas intenções durante minha vida

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Hilde Harb Buzzá por ter se mostrado completamente presente em cada discussão e conversa mesmo que, em parte, a distância. Por sua dedicação e apoio no meu crescimento profissional, me ensinando cada dia um pouco mais sobre ciência. Obrigado por continuar acreditando em mim e neste trabalho, mesmo nos momentos mais difíceis, sempre com entusiasmo e com injeções de ânimo. Admiro muito sua animação para com a vida.

À Profª Drª Cristina Kurachi, por sua coorientação. Obrigado por me receber como seu aluno e me integrar ao grupo. Obrigado pelo tratamento humano com as pessoas ao seu redor e por se colocar no lugar dos outros, entendendo as aptidões e dificuldades de cada um.

Ao Prof. Dr. Vanderlei Salvador Bagnato por dar o direcionamento sob a óptica da física sobre os estudos. Obrigado pela dedicação e paixão pela ciência.

Ao Johan, que sempre se mostrou receptivo quanto a parte profissional e quanto a amizade. Obrigado pelo bom humor e pelos pães de mel.

À Giulia pela serenidade, cuidado e seriedade na forma de ensinar e discutir ciência.

À Ana pelas risadas e pela companhia nos experimentos no laboratório.

À Letícia pela leveza das conversas, por focar nos pontos positivos dos experimentos e pela colaboração nos experimentos *in vivo*.

Ao meu pai, Renato, por ter compreendido as dificuldades que passei, mostrando que se importa comigo. Obrigado por ter lido, corrigido e elogiado minha dissertação. Obrigado pelo apoio na finalização deste projeto. Obrigado por se esforçar e querer manter nosso laço.

à minha mãe, Carla, por buscar manter e fortalecer os laços de nossa família. Obrigado pelo modo de ser e sua espontaneidade. Obrigado pelo cuidado que continua tendo comigo mesmo após ter me tornado um adulto.

À minha Irmã, Isabela, por conseguir me mostrar meu melhor lado. Por me fazer perceber meus amigos. Obrigado pelas conversas e pelos Gins.

Ao Prof. Dr. Gang pela colaboração na pesquisa, sempre empolgado e preocupado com o direcionamento dos estudos.

À Dr^a. Juan Chen por sintetizar e fornecer as nanoemulsões, sempre atenta e inteirada sobre a pesquisa.

À Lili e à Nat, por se mostrarem receptivas, e sempre dispostas a ajudar nos problemas do trabalho e a toda equipe do laboratório de Biofotônica e do Grupo de Óptica.

Ao Didi pela presença bem humorada e atenciosa.

Aos amigos que reencontrei, após a pandemia, Amanda, Caio, Christian, Louis e Victor. Feliz por termos nos encontrado novamente da melhor forma possível, em uma festa.

Aos amigos que conheci no IFSC e na sala 35, Rapha, Gian, Paulo, Maju, Malu, Ian, Bretas por se preocuparem com a data de aniversário de cada um, pelas conversas no República e por retomarem a tradição da pinga de sexta-feira.

À toda a minha família toda por entenderem a dificuldade e o distanciamento que foram necessários durante o mestrado.

Ao Dr. Vinicius Guimarães Ferreira pelos testes realizados no HPLC e o bom humor durante os experimentos.

Ao LAT e ao Liepo pelo suporte tecnológico, em especial ao Guilherme do LAT e ao João do Liepo pelo conserto dos equipamentos.

Ao Prof. Dr. Valtencir Zucolotto pelo acesso ao equipamento de DLS e a técnica Bruna por ensinar a manipulação do equipamento.

Ao IFSC e toda sua infra-estrutura, especialmente a Neusa por seu cuidado com as correções dessa dissertação e ao Ricardo e ao Silvio pelo apoio no serviço de pós graduação.

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de aperfeiçoamento de pessoal de nível superior – Brasil (CAPES) código de financiamento 88887.495902/2020-0

*“You know a moment is important when it is making
your mind go numb with beauty.”*

Friederich Nietzsche

RESUMO

JASINEVICIUS, G.O. **Estudo das propriedades ópticas e térmicas de uma nanoemulsão de indocianina verde e suas aplicações.** 2022. 137 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Terapias fotônicas acontecem a partir da iluminação de moléculas que são cromóforos, ocorrendo a excitação de seus elétrons. Esses elétrons no estado excitado são capazes de voltar ao estado fundamental por diferentes caminhos, podendo gerar espécies reativas de oxigênio e realizar a terapia fotodinâmica, gerar calor usada na terapia fototérmica e imageamento fotoacústico ou emitir fluorescência. A verde (ICG) é capaz de seguir esses diferentes caminhos e vem sendo usada em terapias fotônicas, muitas vezes, com a nanotecnologia para superar seus problemas de agregação e degradação em soluções aquosas. Neste trabalho foi estudada uma nanoemulsão de ICG (NanoICG) quanto a suas propriedades ópticas e térmicas e suas aplicações, comparando com sua forma monomérica livre e dimérica. Testes de HPLC mostraram que houve a dimerização da ICG (dICG), quando na nanoemulsão. Como não há estudos na literatura das características fototérmicas e poucos estudos das características ópticas da dICG, foram feitas análises comparativas entre a ICG, a NanoICG e a dICG extraída da nanoemulsão. Foi encontrado que a fluorescência da dICG possui uma intensidade de menos de 5% em relação a ICG. Além disso, o espectro de absorção mostrou que as moléculas da NanoICG estavam organizadas na forma de agregados-J e a degradação dessa banda de absorção de luz ocorreu com aproximadamente 8 vezes menos intensidade que para a ICG quando submetidas a 37°C em água destilada (H₂O) por 24 horas. A NanoICG se mostrou tão eficiente quanto a ICG quanto a capacidade de produção de calor quando irradiada. Contudo, a NanoICG mostrou taxas reduzidas de fotodegradação, acentuada fotoestabilidade em relação à ICG e capacidade fototérmica superior em *phantoms* de albumina. Com o potencial fototérmico apresentado pela NanoICG, foram realizados testes de terapia fototérmica *in vivo* em modelo murino de melanoma cutâneo. Tanto a NanoICG quanto a ICG aplicadas de forma intratumoral na concentração de 156 µg/mL foram capazes eliminar os tumores após sua irradiação. Portanto, a NanoICG formada de dICG é mais estável em meios aquosos que a ICG e possui uma capacidade fototérmica similar à ICG, com fotoestabilidade superior. Além disso, a NanoICG ainda pode ser explorada em seu potencial de carregar outras moléculas em seu interior.

Palavras-Chaves: Indocianina verde. Terapia fototérmica. Nanoemulsão. Nanotecnologia. Melanoma.

ABSTRACT

JASINEVICIUS, G.O. **Study of optical and thermal properties of an indocyanine green nanoemulsion and its applications.** 2022. 137p. Dissertation (Master of Science) – Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2022.

Photonic therapies occur by the irradiation of chromophore molecules, which excites its electrons. These electrons in the excited state are able to return to the ground state through different paths, which may generate reactive oxygen species to perform photodynamic therapy, may generate heat to perform photothermal therapy and photoacoustic imaging, or may emit fluorescence. Indocyanine Green (ICG) is able to produce all these results and has been used for photonic therapies, and often is combined with nanotechnology to overcome its problems of aggregation and degradation in aqueous solution. In this dissertation, a nanoemulsion of ICG (NanoICG) was studied regarding its optical and thermal properties for application, with comparisons to its monomeric and dimeric free forms. HPLC tests showed a dimerization of ICG (dICG) while in the interface of the nanoemulsion. As in the literature there are no studies on the photothermal characteristics and few studies on the optical characteristics of dICG, comparative analyzes were carried out between ICG, NanoICG and dICG extracted from the nanoemulsion. It was found that the fluorescence of dICG has an intensity less than 5 % in comparison to ICG. In addition, the absorption spectrum showed that NanoICG's molecules were organized in a J-aggregates fashion and the degradation of its peak occurred in an 8 times less intense way than ICG's peak, both under 37°C in distilled water for 24 hours. NanoICG proved to be as efficient as ICG in terms of its ability to produce heat when irradiated. However, NanoICG showed reduced rates of photodegradation, marked photostability relative to ICG and superior photothermal capacity in albumin phantoms. With the photothermal potential presented by NanoICG, *in vivo* photothermal therapy tests were performed in a murine model of cutaneous melanoma. Both NanoICG and ICG, were applied intratumorally at a concentration of 156 µg/mL and were able to eliminate the tumor after its irradiation. In conclusion, NanoICG formed by dICG is more stable in aqueous solutions than ICG and has a similar photothermal capacity to ICG, with superior photostability. In addition, NanoICG can still be explored by its potential to carry other molecules inside of it.

Keywords: Indocyanine green. Photothermal therapy. Nanoemulsion. Nanotechnology. Melanoma.

Lista de Figuras

- Figura 1 - Destaque da janela óptica no espectro da luz de 300 nm a 1000 nm com exemplos de fotossensibilizadores 26
- Figura 2 - Diagrama de Jablonski mostrando esquematicamente o modo em que os elétrons interagem com a luz e sua funcionalidade. A seta roxa representa a absorção da luz pela molécula para que o elétron fique no estado excitado, a seta vermelha representa o decaimento do elétron por fluorescência para o estado fundamental, a seta azul escura representa o decaimento do elétron por relaxação vibracional e a seta azul claro representa o seu decaimento por fosforescência. 27
- Figura 3 - Estrutura química da ICG e seu espectro de absorção e emissão da luz 32
- Figura 4 - Comportamento do espectro de absorção de luz da Indocianina Verde sendo aquecida a 65°C. 33
- Figura 5 - Subprodutos da degradação da ICG em s) fragmentos contendo carbonila, em b) pentametina truncada e em c) dímero oxidativo 34
- Figura 6 - Processo proposto na dimerização da ICG em metanol com a ação de oxigênios singletos. 35
- Figura 7 - Estrutura da ICG e do dímero de ICG. 36
- Figura 8 - Equipamentos de iluminação utilizados, sendo em a) a lasertable de 808 nm irradiando uma amostra e em b) uma biotable de 850 nm com seus LEDs. 47
- Figura 9 - Phantom sendo irradiado com a agulha térmica acoplada. 50
- Figura 10 - Camundongo preparado para o tratamento, com amostra injetada no tumor e agulha termográfica acoplada no mesmo. 52
- Figura 11 - Em a) distribuição do tamanho dos diâmetros em nanômetros da NanoICG recentemente sintetizada e em b) dados sobre a média do tamanho dos diâmetros da nanoemulsão, seu PDI, sua frequência máxima de diâmetro e a qualidade da triplicata. 53
- Figura 12 - Em a) distribuição do tamanho dos diâmetros em nanômetros da NanoICG após 6 meses da síntese e em b) dados sobre a média do tamanho dos diâmetros da nanoemulsão, seu PDI, , sua frequência máxima de diâmetro e a qualidade da triplicata. 54

Figura 13 - Tempo de retenção em minutos em a) da ICG recentemente preparada, em b) da ICG extraída logo após a síntese da Nanoemulsão, em c),da ICG extraída 2 dias após a síntese da Nanoemulsão e em d) da ICG extraída 12 dias após a síntese da Nanoemulsão.	56
Figura 14 - Estrutura química da dICG sem seus cátions de sódio	57
Figura 15 - Cromatograma do espectro de massas encontrados nos picos referentes aos tempos encontrados. Em a) encontra-se o espectro de massas referente ao pico de aproximadamente 3 minutos com a estrutura molecular da ICG ao seu lado e em b) encontra-se o espectro de massas referente ao pico de aproximadamente 2,8 minutos com a estrutura molecular da dICG ao seu lado.	59
Figura 16 - Tempo de retenção do HPLC em relação a abundância relativa em a) da ICG recentemente preparada e em b) da ICG extraída da NanoICG.	60
Figura 17 - Tempo de retenção do HPLC em relação a abundância relativa das espécies das moléculas em a) da ICG com a estrutura química da molécula ao seu lado e em b) das moléculas extraídas da NanoICG. Com a estrutura química ao seu lado	61
Figura 18 - Tempo de retenção do HPLC em relação a abundância relativa das moléculas extraídas da NanoICG em a) após 3 meses de sua síntese e em b) após 1 ano de sua síntese.	62
Figura 19 - Nanoemulsão de Indocianina Verde (NanoICG) após a dimerização da ICG.	63
Figura 20 - Redução de fluorescência com o tempo da NanoICG excitada em 770 nm e dissolvida em metanol ou H ₂ O.	64
Figura 21 - Fluorescência da NanoICG 2,5 μM, dICG 2,5μM e ICG 5 μM em PBS e metanol quando excitadas em 770nm.	65
Figura 22 - Espectro de absorção óptica da ICG e da NanoICG em a) em metanol e em b) em H ₂ O.	67
Figura 23 - Em a) esquema da molécula da ICG) e em b) modo de formação dos agregados-J com a ICG.	68
Figura 24 - Espectro de absorbância em diferentes solventes na concentração de 3,9 μg/mL de a) NanoICG e b) ICG.	69
Figura 25 - ICG em metanol e NanoICG em metanol ou H ₂ O.	70

Figura 26 - NanoICG a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluída em uma mistura de 50% metanol e 50% PBS ou 50% metanol e 50% H ₂ O.	71
Figura 27 - Em a) NanoICG (3,9 $\mu\text{g/mL}$) diluída em uma mistura de metanol e PBS, em b) NanoICG (3,9 $\mu\text{g/mL}$) diluída em uma mistura de metanol e H ₂ O. Em c) variação de absorção de luz da NanoICG em $\lambda = 780\text{nm}$ e em d) em $\lambda = 894 \text{ nm}$.	72
Figura 28 - Formação de agregados-J da dICG após 1 mês ou 3 meses de diluição.	73
Figura 29 - NanoICG diluída em H ₂ O em diferentes concentrações.	75
Figura 30 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da NanoICG diluída em H ₂ O.	75
Figura 31- NanoICG diluída em metanol em diferentes concentrações.	76
Figura 32 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da NanoICG diluída em metanol.	77
Figura 33 - dICG diluída em metanol em diferentes concentrações.	78
Figura 34 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da dICG diluída em metanol.	79
Figura 35 - dICG diluída em metanol em diferentes concentrações.	80
Figura 36 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da dICG diluída em metanol.	81
Figura 37 - Estabilidade de 24 horas do espectro de absorção de luz da NanoICG, dICG e ICG a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em PBS deixadas em a) a 4°C em b) a 25 °C e em c) a 37°C.	83
Figura 38 - Absorbância normalizada após 24 horas do ponto máximo de absorção de luz de cada solução em diferentes temperaturas diluídas em PBS.	84
Figura 39 - Estabilidade de 24 horas do espectro de absorção de luz da NanoICG, dICG e ICG a 3,9 mg/mL diluídas em H ₂ O deixadas em a) a 4°C, em b) a 25 °C e em c) a 37°C.	86
Figura 40 - Absorbância normalizada após 24 horas do comprimento de onda de maior absorção de luz de cada solução em diferentes temperaturas diluídas em H ₂ O.	87

Figura 41 - Fotodegradação da NanoICG 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluída em H ₂ O irradiada em a) a 780 nm e 62,2 mW/cm ² , em b) a 808 nm e 119,3 mW/cm ² e em c) a 850 nm e 32,8 mW/cm ² .	89
Figura 42 - Decaimento normalizado da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm em a) da NanoICG irradiada com os comprimentos de onda em 780 nm, 808 nm e 850 nm. NanoICG irradiada em b) mostrando o comportamento da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm da NanoICG irradiada em 780 nm, 808 nm e 850 nm.	91
Figura 43 - Fotodegradação da NanoICG 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluída em PBS irradiada em a) 780 nm e 62,2 mW/cm ² , em b) 808 nm e 119,3 mW/cm ² e em c) 850 nm e 32,8 mW/cm ² .	92
Figura 44 - Decaimento normalizado da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm em a) da NanoICG irradiada com os comprimentos de onda de em 780 nm, 808 nm e 850 nm. Decaimento normalizado da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm em b) da NanoICG irradiada com os comprimentos de onda de em 780 nm, 808 nm e 850 nm.	93
Figura 45 - Fotodegradação da ICG em a) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em PBS, em b) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em H ₂ O, em c) diluída em 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS e em d) em 156 $\mu\text{g/mL}$ em H ₂ O.	95
Figura 46 - Decaimento da absorção óptica em $\lambda = 780$ nm da ICG em diferentes nas concentrações 3,9 $\mu\text{g/mL}$ ou 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS ou H ₂ O.	97
Figura 47 - Fotodegradação da dICG em a) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em PBS, em b) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em H ₂ O, em c) diluída em 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS e em d) em 156 $\mu\text{g/mL}$ em H ₂ O.	99
Figura 48 - Decaimento de absorção de luz em $\lambda = 894$ nm da dICG em diferentes nas concentrações 3,9 $\mu\text{g/mL}$ ou 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS ou H ₂ O.	100
Figura 49 - Fotodegradação da NanoICG em a) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em PBS, em b) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em H ₂ O, em c) diluída em 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS e em d) em 156 $\mu\text{g/mL}$ em H ₂ O.	101
Figura 50 - Decaimento da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm da NanoICG em diferentes nas concentrações 3,9 $\mu\text{g/mL}$ ou 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS ou H ₂ O.	102
Figura 51 - Aumento de temperatura de amostras da ICG e NanoICG em 156 $\mu\text{g/mL}$ e 1 mL em diferentes solventes irradiadas com laser em 810 nm e 1 W/cm ² .	104
Figura 52 - Perfil de emissão de radiação do laser durante os experimentos de fotoestabilidade.	105

Figura 53 - Fotoestabilidade da ICG e NanoICG 39 $\mu\text{g/mL}$ em diferentes solventes após 7 ciclos de 180 s do laser ligado em 1 W/cm^2 , 810 nm e 360 s desligado.	106
Figura 54 - Em a) espectro de absorção da NanoICG e da ICG em 39 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O antes e após os ciclos ligado e desligado de irradiação. Em b) espectro de absorção da NanoICG e da ICG em 39 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O com triton antes e após os ciclos ligado e desligado de irradiação.	107
Figura 55 - Fotoestabilidade da ICG e NanoICG 39 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O com 0,1% triton após 7 ciclos de 180 s do laser ligado em 1 W/cm^2 , 810 nm e 360 s desligado.	108
Figura 56 - Fração de luz entregue (I) e transpassada pela amostra (I_0) após irradiação com laser em 810 nm e 1 W/cm^2 .	109
Figura 57 - Estabilidade da quantidade de calor produzida em diferentes ciclos de uma molécula fotoestável.	111
Figura 58 - Diminuição do número de moléculas fotoativas com o tempo devido à fotodegradação dos ciclos On/Off.	112
Figura 59 - Perda de eficiência da quantidade de calor produzida em diferentes ciclos de uma molécula com fotoestabilidade limitada.	112
Figura 60 - Comparação da temperatura máxima produzida a cada ciclo On/Off da NanoICG e da ICG, após o segundo ciclo e comparação entre a porcentagem de centros opticamente ativados a cada irradiação em relação ao segundo ciclo.	114
Figura 61 - Variação de temperatura de phantoms irradiado com 0,5 W/cm^2 por 10 minutos.	116
Figura 62 - Amostras com diferentes tempos de irradiação a 0,5 W/cm^2 , sendo em a) o controle, b) ICG 156 $\mu\text{g/mL}$, c) dICG 156 $\mu\text{g/mL}$ e d) NanoICG 156 $\mu\text{g/mL}$.	118
Figura 63 - Variação de temperatura de phantoms irradiado com 1 W/cm^2 por 10 minutos.	119
Figura 64 - Controle 1 W/cm^2 , ICG 156 $\mu\text{g/mL}$ 1 W/cm^2 , dICG 156 $\mu\text{g/mL}$ 1 W/cm^2 , NanoICG 156 $\mu\text{g/mL}$ 1 W/cm^2 .	120
Figura 65 - Variação de temperatura de melanomas cutâneos in vivo com iluminação a 810nm e 0,5 W/cm^2 por 10 minutos.	122

Figura 66 - Imagens termográficas de melanoma cutâneo após irradiação de 600 J/cm² em 810 nm em a) após a injeção intratumoral de PBS, em b) sem nenhuma substância em c) com dICG na concentração final de 156µg/mL, em d) com a NanoICG na concentração final de 78 µg/mL, em e) com a NanoICG na concentração final de 156µg/mL e em f) com ICG na concentração final de 156µg/mL. 123

Figura 67 - Imagens da PTT nos períodos antes da injeção intratumoral, após a injeção intratumoral, após a irradiação de 10 minutos, 3 dias após o tratamento, 7 dias após o tratamento e 14 dias após o tratamento. Utilizando para a injeção intratumoral em a) a NanoICG 78g/mL, em b) a NanoICG 156µg/mL, em c) os dímeros 156µg/mL e em d) a ICG 156µg/mL. 125

Figura 68 - Recidiva de tumores após 14 dias da PTT com NanoICG 78 µg/mL e dICG 156 µg/mL. 126

Sumário

1 INTRODUÇÃO	25
1.1 Princípios Básicos da Interação da Luz com diferentes moléculas	25
1.2 Terapias Fotônicas	28
<i>1.2.1 Terapia Fotodinâmica</i>	28
<i>1.2.2 Terapia fototérmica</i>	30
1.3 Indocianina Verde (ICG)	31
<i>1.3.1 Dimerização da Indocianina Verde</i>	34
1.4 Nanotecnologia	36
1.5 Nanoemulsões	37
1.6 Uma possibilidade contra o melanoma	39
2 OBJETIVOS	41
2.1 Objetivos específicos	41
3 METODOLOGIA	43
3.1 Síntese da Nanoemulsão de Indocianina Verde (NanoICG)	43
3.2 Extração dos dímeros de ICG (dICG)	43
3.3 Molécula de ICG, NanoICG, dICG e diluições	43
3.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)	44
3.5 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)	44
3.6 Caracterização do espectro de fluorescência	45
3.7 Caracterização do espectro óptico em meios aquosos com alterações de temperaturas e solventes	45
<i>3.7.1 Estabilidade da NanoICG em mistura de solventes</i>	45
<i>3.7.2 Lei de Beer Lambert</i>	46
<i>3.7.3 Termoestabilidade do espectro de absorção óptico em diferentes solventes</i>	46
3.8 Equipamentos de iluminação	46
3.9 Fotodegradação	47
<i>3.9.1 Fotodegradação da NanoICG com variações de solventes e irradiações</i>	47
<i>3.9.2 Fotodegradação em $1W/cm^2$ e 810 nm</i>	48
3.10 Medidas de temperatura	49
3.11 Testes de potencial fototérmico e de fotoestabilidade com ciclos de irradiação periódicos	49
3.12 Phantoms térmicos	49
<i>3.12.1 Fabricação dos Phantoms</i>	49
<i>3.12.2 Parâmetros de iluminação</i>	50

3.13 Estudos em modelo de melanoma cutâneo murino.....	51
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS).....	53
4.2 Cromatografia líquida de alta performance.....	55
4.3 Caracterização do espectro de fluorescência.....	63
4.4 Caracterização do espectro óptico em meios aquosos com alterações de solventes e temperaturas	66
4.4.1 Estabilidade da NanoICG com mistura de solventes.....	71
4.4.2 Extração dos dímeros de ICG para análise de seu espectro de absorção óptico	73
4.5 Lei de Beer Lambert.....	74
4.5.1 NanoICG em H ₂ O.....	74
4.5.2 NanoICG em metanol.....	76
4.5.3 dICG em H ₂ O.....	78
4.5.4 dICG em metanol.....	79
4.6 Termoestabilidade em diferentes solventes	81
4.6.1 NanoICG, dICG e ICG e em PBS	82
4.6.2 NanoICG, dICG e ICG em H ₂ O.....	85
4.7 Fotodegradação da NanoICG com variações de solventes e irradiações.....	88
4.7.1 NanoICG em H ₂ O.....	88
4.7.2 NanoICG em PBS.....	91
4.8 Fotodegradação 1 W/cm ² e 810 nm.....	94
4.8.1 ICG.....	94
4.8.2 dICG.....	98
4.8.3 NanoICG.....	101
4.9 Caracterização fototérmica e de fotoestabilidade.....	103
4.9.1 Potencial fototérmico.....	103
4.9.2 Testes de fotoestabilidade com ciclos de irradiação periódicos.....	104
4.9.3 Cálculos de fotodegradação	108
4.10 Phantoms térmicos	115
4.10.1 Testes em phantoms irradiados em 0,5 W/cm ² e 810 nm.....	115
4.10.2 Testes em phantoms irradiados em 1 W/cm ² e 810 nm.....	118
4.11 Estudos em modelo de melanoma cutâneo murino.....	121
4.11.1 Registros térmicos da PTT.....	121
4.11.2 Análise dos tumores.....	124
5 CONCLUSÃO.....	129
REFERÊNCIAS	131

Anexo A – Certificado de aprovação do comitê de ética 141

1 INTRODUÇÃO

1.1 Princípios Básicos da Interação da Luz com diferentes moléculas

O uso da luz vem sendo cada vez mais explorado na área da saúde e nas ciências da vida. Sua aplicação varia desde o uso em diagnósticos, como o uso de fluorescência e imageamento fotoacústico, até o tratamento de diferentes doenças, com técnicas como a terapia fototérmica (PTT, do inglês *photothermal therapy*) e a terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*). Essas técnicas ópticas apresentam grandes benefícios do ponto de vista prático devido, especialmente, ao seu caráter não invasivo, rápido e seletivo. (1) Um tipo de molécula muito utilizada nessa área são as chamadas fototeranósticas, que são possuem propriedades cromóforas, e, portanto, possuem a capacidade de interagir com a luz, possuindo utilidade tanto para auxiliar o diagnóstico de doenças (por exemplo, imageamento), quanto para o seu uso em tratamentos. Para uma aplicação adequada em terapias *in vivo*, as moléculas fototeranósticas devem absorver a luz em comprimentos de onda específicos. (1-2)

Certos comprimentos de onda, como determinadas faixas do infravermelho próximo (IVP) (780 nm – 2500nm) (3), são mais eficientes para penetrar em tecidos biológicos e atingir tecidos e órgãos mais profundos dos seres vivos, promovendo uma resposta volumétrica maior. A luz incidida nos tecidos biológicos sofre a atenuação causada pelo espalhamento e absorção dos componentes dos tecidos no caminho óptico. Moléculas como a água, melanina e hemoglobina limitam a penetração da luz no tecido. Contudo, para comprimentos de onda entre 600 e 900 nm, região chamada de primeira janela terapêutica ou janela óptica, essa atenuação ocorre em menor grau, sendo esses comprimentos de onda mais utilizados em fototerapias. A melanina, por exemplo, absorve em torno de 70% menos luz no comprimento de onda de 700 nm em relação ao comprimento de onda de 500 nm. (4)

A Figura 1 mostra que na faixa de comprimentos de onda entre 300 nm e 650 nm há um coeficiente de absorção de luz maior de moléculas como hemoglobina e melanina. Já a água, possui um coeficiente de absorção de luz menor do que as biomoléculas citadas nos comprimentos de onda mostrados, mas com um aumento progressivo em seu coeficiente a partir da região entre 400 e 500 nm até aproximadamente 1000 nm. (4) Especialmente acima de 1300 nm há uma elevada capacidade de absorção de luz pela água. (5) Assim sendo, a região da janela óptica que abarca comprimentos de onda da luz vermelha e do IVP são as mais indicadas para atingir tecidos mais profundos, devido à menor atenuação da luz. (4-5)

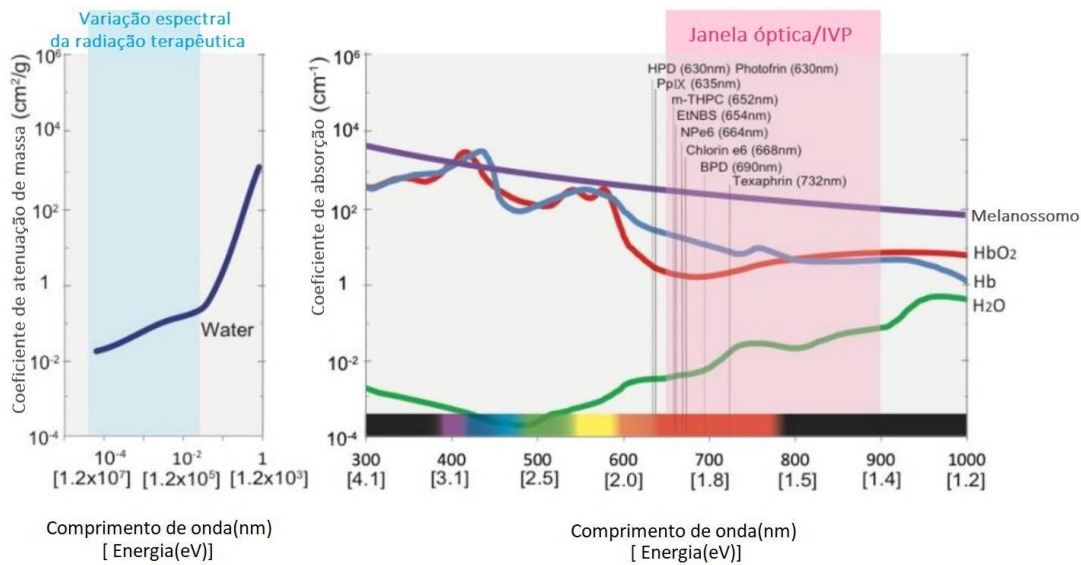


Figura 1 - Destaque da janela óptica no espectro da luz de 300 nm a 1000 nm com exemplos de fotossensibilizadores

Fonte: Adaptada de MALLIDI *et al.* (4)

Para melhor se compreender a interação entre a luz e tecidos biológicos, são utilizados *phantoms* que simulam as propriedades desses tecidos. É possível, com eles, testar e determinar parâmetros mais eficientes em experimentos de imageamento de fluorescência de alta resolução, terapias fotodinâmica e fototérmica, cirurgias a laser, entre outros. (6)

Apesar de existirem *phantoms* formados de materiais como polímeros não orgânicos e silicone, há uma tendência ao uso de substâncias como ágar, gelatina ou colágeno que permitem a incorporação de constituintes celulares. (7) Para realizar uma imitação efetiva do tecido alvo, é necessário levar em conta as propriedades de absorção e espalhamento da luz no comprimento de onda desejado. Entendendo essa interação da luz com a matéria, especialmente com os tecidos biológicos, é possível aplicá-la de forma mais segura e efetiva para diferentes terapias. (6–8)

Quando a luz é capaz de interagir com um cromóforo no comprimento de onda adequado, ocorre uma transição dos elétrons do estado fundamental da molécula alvo para o estado eletrônico excitado. (9) A absorção da luz pelos cromóforos ocorre principalmente devido aos segmentos π conjugados com elétrons deslocalizados. A Figura 2 representa o diagrama de Jablonski, que dentre outros processos, mostra que a luz absorvida pela molécula excita seus elétrons do estado fundamental (S_0) para o estado de singleto excitado (S_1). (10)

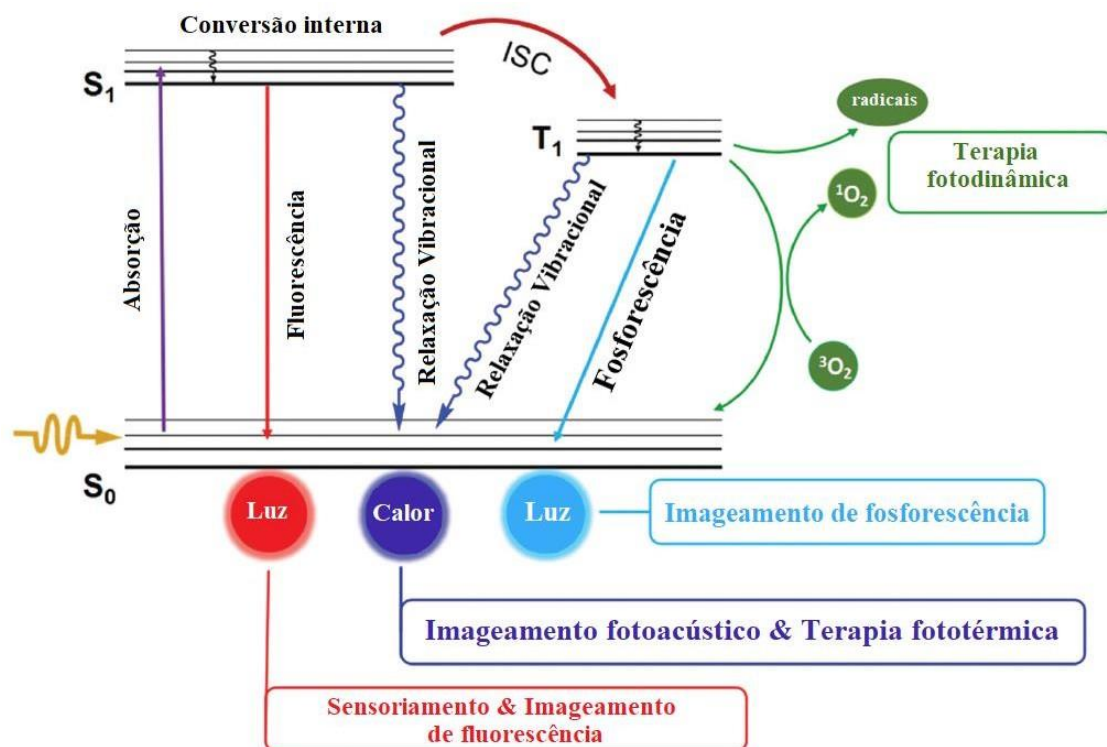


Figura 2 - Diagrama de Jablonski mostrando esquematicamente o modo em que os elétrons interagem com a luz e sua funcionalidade. A seta roxa representa a absorção da luz pela molécula para que o elétron fique no estado excitado, a seta vermelha representa o decaimento do elétron por fluorescência para o estado fundamental, a seta azul escura representa o decaimento do elétron por relaxação vibracional e a seta azul clara representa o seu decaimento por fosforescência.

Fonte: Adaptada de FENG *et al.* (10)

Quando os elétrons estão em seu estado excitado, o retorno ao estado fundamental pode ocorrer através de diferentes caminhos, entre eles a fluorescência, a fosforescência, a relaxação vibracional e a produção de radicais livres. A Figura 2 mostra os modos em que a energia pode ser dissipada. A dissipação radiativa pode produzir a fluorescência, que consiste na emissão de luz pela molécula em um comprimento de onda maior do que da luz absorvida. (10) No caso das biomoléculas, o tempo de duração é curto, entre 10^{-9} e 10^{-7} s de duração, após a iluminação, e pode ser utilizada para o diagnóstico de doenças. (11) Moléculas como a fluoresceína e a Indocianina Verde (ICG, do inglês, *Indocyanine Green*) são exemplos do uso de cromóforos fluorescentes usados em aplicações clínicas de angiografias da circulação vascular ocular. (12-13)

Já o retorno dos elétrons por relaxação vibracional, produz calor que pode ser usado em terapias que visam a hipertermia celular, como a PTT. Outra forma que o elétron se comporta, ao chegar em seu estado excitado, é com a mudança na multiplicidade dos spins, podendo ocorrer o cruzamento intersistema (ISC, do inglês, *Intersystem Crossing*), transicionando os

elétrons do estado singleto excitado (S_1) para o estado tripleto (T_1), onde há a possibilidade de retorno ao estado fundamental por outro processo radiativo, chamado de fosforescência. Além disso, quando os elétrons da molécula estão no estado T_1 , eles também podem decair por relaxação vibracional ou interagir com o oxigênio molecular próximo e com outros substratos formando espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*), como o oxigênio singleto. (10)

Levando em conta as particularidades de cada molécula cromófora, há uma diferente aplicação no seu uso. O tipo de aplicação irá depender do modo em que os elétrons excitados da molécula alvo voltam para o seu estado fundamental. As terapias que se utilizam da luz e das propriedades dos cromóforos são chamadas de terapias fotônicas. (10)

1.2 Terapias Fotônicas

1.2.1 Terapia Fotodinâmica

Uma das aplicações das moléculas após sua excitação com a luz é a chamada terapia fotodinâmica, utilizada tanto para o combate de microrganismos quanto na área da oncologia. Para que ocorra a PDT é necessário que a molécula absorvedora da luz, chamada de fotossensibilizador (FS), absorva a luz no comprimento de onda adequado e, com a formação de espécies reativas, promova a morte celular desejada. Para que o FS seja considerado um bom agente fotodinâmico, certos parâmetros devem ser atendidos, tais como pureza química, alta reatividade fotoquímica, estabilidade a temperatura ambiente, fotoatividade em comprimentos de onda adequados, citotoxicidade reduzida no escuro, além de boa solubilidade nos tecidos humanos. (14)

Durante a PDT podem ocorrer dois tipos de reação, a Tipo 1 e a Tipo 2. A partir da reação do Tipo 1 ocorre a formação de ROS como ânions superóxidos, peróxidos de hidrogênio e radicais hidroxila. A formação desses ânions ocorre com a transferência de elétrons do FS no estado tripleto diretamente para o oxigênio molecular. Os ânions superóxidos reagem entre si formando os peróxidos de hidrogênio (H_2O_2). Finalmente, o H_2O_2 pode ser convertido com a catálise de íons metálicos para a formação de radicais hidroxila (OH^\bullet), que são altamente reativos e facilmente atravessam as membranas celulares causando danos oxidativos a ácidos graxos e outros lipídeos através de reações em cadeia. (15)

Já a reação do Tipo 2 produz oxigênio singleto (1O_2), que são formados com a transferência de energia dos elétrons no estado tripleto do FS para o oxigênio no seu estado

fundamental. O agente oxidante $^1\text{O}_2$ é capaz de reagir com diversas moléculas orgânicas, como lipídeos insaturados, ácidos nucleicos, em especial a guanina, e diversos tipos de resíduos de aminoácidos, incluindo alvos importantes como a tirosina, histidina, cisteína, metionina, e o triptofano. Para uma terapia eficiente, essas espécies geradas tanto pela reação do tipo 1 quando pela reação do tipo 2, devem levar as células alvo à morte. (16)

Para que as ROS formadas, como os $\text{OH}\cdot$ e os $^1\text{O}_2$, desempenhem seu papel na PDT, é necessário que sejam geradas em regiões próximas aos alvos, já que, apesar de serem altamente reativas, possuem tempo de meia-vida reduzido. O oxigênio singlete possui uma meia-vida menor que 40 ns, o que significa que os danos celulares causados por ele são restritos à uma pequena área onde são formados, tendo seu raio de ação de aproximadamente 20 nm. Quando há danos causados pelos ROS em moléculas como DNA, lipídios e proteínas, as células podem desencadear processos relacionados à sua morte como a apoptose, necrose e autofagia. (15,17)

Levando-se em conta o modo e os mecanismos como a PDT é realizada, pode-se destacar vantagens ao seu uso quanto a propriedade não invasiva de tratamento, a capacidade de seletividade tumoral, a delimitação o tratamento à área de irradiação, a reduzidos efeitos colaterais e à capacidade imunogênica. (18–20) Com isso, a PDT mostra potencial para o uso terapêutico em sistemas biológicos, sendo um método já aplicado para o tratamento de alguns tipos de câncer, em especial, o câncer de pele do tipo não melanoma. (21-22)

Apesar das vantagens apresentadas pela técnica, existem desafios para seu funcionamento, otimização e ampliação para tratamento de tumores mais agressivos e profundos. Um deles é a dificuldade da entrega da luz a tecidos biológicos mais profundos, sendo importante a capacidade do fotossensibilizador de absorver a luz na região da janela óptica. Além disso, o FS necessita interagir com a célula alvo, para que haja seu acúmulo na região tumoral. Além disso, a região do tratamento deve possuir oxigênio molecular suficiente para que a molécula utilizada produza uma quantidade eficaz de ROS para realizar a morte celular. Assim sendo, para que a PDT ocorra é preciso garantir durante os tratamentos quantidades suficientes de FS, luz e oxigênio. (18-19)

No intuito de aumentar a eficácia do uso da PDT para tratamentos oncológicos, a nanotecnologia vem sendo estudada, especialmente para entrega do FS ao tecido alvo. Além disso, a sua conjugação da PDT com outras técnicas como imunoterapia, quimioterapia e, mais recentemente, com a terapia fototérmica. A PTT também se utiliza da luz e sua conjugação com a PDT pode gerar resultados promissores no tratamento de tumores, se mostrando uma linha de investigação que vem ganhando atenção nos últimos anos. (18,20)

1.2.2 Terapia fototérmica

A terapia fototérmica emprega a capacidade dos agentes fototérmicos em produzir calor quando irradiados com luz, uma vez que esse aumento de energia térmica pode ser focado para o combate de células tumorais. (23-24) Através da hipertermia celular é possível realizar a morte de células tumorais alvo (25), sendo a PTT um método que se destaca por possuir uma área restringível de atuação, ser barata e minimamente invasiva para o tratamento. O tratamento consiste na absorção da luz no comprimento de onda adequado pelo agente fototérmico (AF) para que seus elétrons cheguem ao estado excitado. Essa energia é convertida em calor por relaxação vibracional dos elétrons, produzindo uma hipertermia na região em que o AF se encontra (10,24,26), com um aumento de temperatura maneira uniforme e localizado na região tumoral. (27)

Comprimentos de onda pertencentes à janela terapêutica são mais adequados para o uso em tecidos biológicos devido à menor absorção de luz de moléculas endógenas, menor fototoxicidade e maior penetração no tecido. (26) A produção de calor causada pelo relaxamento vibracional dos agentes fototérmicos excitados pela luz vão causar fenômenos como a apoptose e necrose celular dependendo da temperatura alcançada. (28,29) A partir de 41°C ocorrem mudanças nos padrões de expressão genético das células assim como a produção, em alguns tipos de câncer, de *heat-shock proteins* (29), uma família de proteínas com expressão induzida por estímulos estressores como choques de calor e que possuem um papel importante carcinogênese, tanto no desenvolvimento quanto na progressão do câncer. (30) Aumentos de temperatura celular acima de 42°C acarreta o início de processos como agregação e desnaturação proteica, lise celular e evaporação do citosol. (29) De 43°C a 50°C ocorre o processo de apoptose celular e em temperaturas mais elevadas que 50°C, ocorre com mais intensidade a necrose celular, que estimula uma resposta inflamatória local. (28) Devido ao estresse celular causado pela necrose, sendo um estímulo pró inflamatório que aumenta a produção de *heat-shock proteins* nas células sob estresse, é interessante que a morte celular ocorra por apoptose, processo que desencoraja uma resposta inflamatória. (29,31) Além disso, para uma PTT eficaz é importante que haja a completa eliminação do tumor sem que ocorra danos significativos aos tecidos adjacentes, promovendo um tratamento localmente eficaz, sem que aconteça o recrescimento tumoral ou metástase. (28)

Levando em conta os desafios que o câncer promove para o sistema de saúde atualmente (32), há grandes obstáculos a serem superados como a resistência a fármacos, a metástase do tumor e os efeitos colaterais dos tratamentos tidos como padrão ouro. (33) A PTT vem

mostrando vantagens no tratamento anticâncer devido à sua seletividade de aumento de temperatura, efeitos colaterais e invasividade mínimos. (32-33) Contudo, para que a PTT possa ser aplicada na clínica, ainda existem aspectos essenciais para serem estudados, tais como melhora dos resultados de morte tumoral em *in vitro* e da taxa de tratamento completo *in vivo* por hipertermia e a investigação a longo prazo dos efeitos da PTT. (32)

A PTT também possui ainda outros desafios a serem superados para uma melhora de seus resultados. (32) Entre eles está a necessidade do AF se acumular em quantidades suficientes que com a irradiação, a PTT consiga alcançar temperaturas altas o suficiente para a morte celular tumoral. Não se deve haver acúmulos nos arredores das células cancerosas, para que se evite o aquecimento de tecidos saudáveis. Além disso, para que a luz alcance tecidos biológicos mais profundos, com menor espalhamento e atenuação da luz, é necessário o uso de um AF que absorva luz preferencialmente no IVP. Por outro lado, a nanotecnologia se alia a PTT no intuito de melhorar a entrega do fármaco, além de poder aumentar sua estabilidade e seletividade. (34) Variações quanto ao tamanho ou superfície química das NPs são alguns caminhos que vem sendo estudados para melhorar a seletividade do AF. (18)

1.3 Indocianina Verde (ICG)

A Indocianina Verde é um corante anfifílico da classe das cianinas, aniônico, solúvel em água e com um peso molecular de 774,96 Da. (35) Sua estrutura molecular está mostrada na Figura 3. Essa molécula é capaz de absorver luz no infravermelho próximo no espectro entre 700 e 830 nm e emitir fluorescência no espectro entre 760 e 870 nm (Figura 3) (36-37), e já vem sendo utilizada para técnicas de bioimageamento em aferições quantitativas hepáticas e cardíacas. Além disso, devido a sua propriedade tanto de converter luz em calor como de gerar ROS a partir da incidência da luz, vem sendo usada tanto para a PDT quanto para PTT, possuindo ainda a vantagem de absorver luz no IVP na região da janela óptica. Esse composto é pouco tóxico ao corpo humano e, desde 1954, é aprovado pela agência regulatória dos Estados Unidos, *Foods and Drugs Administration* (FDA) para aplicações clínicas. (38-40)

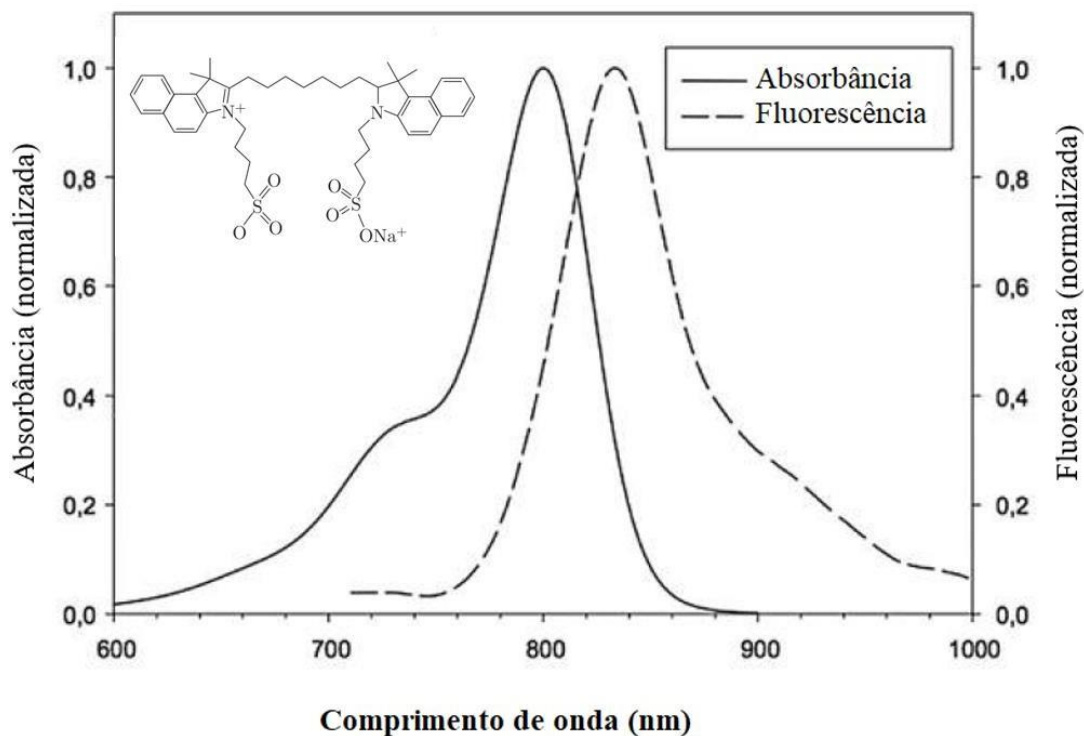


Figura 3 -Estrutura química da ICG e seu espectro de absorção e emissão da luz

Fonte: Adaptada de TOPALOGLU *et al.*; SHENG *et al.*(35-36)

Durante sua aplicação, a molécula anfifílica se mostra segura e bem tolerada pelo organismo humano, sendo excretada por via hepática devido a sua alta propensão de se ligar a proteínas plasmáticas como a albumina, com uma meia-vida de aproximadamente 2.4 minutos, quando injetada de forma intravenosa. (41–43) A meia-vida da ICG indica possuir grande correlação com a metabolização do fígado pois quando utilizada em pacientes com função hepática debilitada, há um aumento em sua meia-vida. (43) Além disso, a ICG apresenta problemas relacionados à rápida degradação quando em soluções aquosas e ao entrar em contato com a luz. (42-43) Essa degradação, além de resultar em perdas das propriedades da ICG, ainda pode gerar subprodutos tóxicos ao ser humano. Outro problema recorrente em corantes como a ICG é a sua agregação em soluções aquosas, em que há dependência da solubilidade do solvente utilizado (44–46). Existem variações nas propriedades fotofísicas da molécula, como fluorescência e fotoestabilidade, dependendo se ela se encontra na forma de monômeros ou de agregados como dímeros, trímeros, oligômeros e agregados-J. (42,44–46) Em solventes como a água, a ICG apresenta duas bandas de absorção de luz principais, cujo os máximos de intensidade estão em $\lambda = 780$ nm e em $\lambda = 715$ nm. A Figura 5 mostra o comprimento de onda mais intenso de $\lambda = 780$ nm para a banda dos monômeros da molécula, e

o comprimento de onda mais intenso de $\lambda = 715$ nm para a banda dos agregados-H, formados por dímeros não covalentes de ICG ligados face a face (*face-to-face*). (44,46) Outra importante característica da ICG mostrada na Figura 4 é a formação da banda de absorção de luz dos agregados-J, formada com o aquecimento da solução e com intensidade máxima em $\lambda = 895$ nm. Esses agregados da cianina ocorrem quando uma molécula de ICG se liga a outras no estilo cabeça à cauda (*head-to-tail*) através de ligações π - π . Fatores como o estoque da ICG em concentrações maiores que 1 mg/mL e o aquecimento da solução promovem a formação de agregados-J. (46–48)

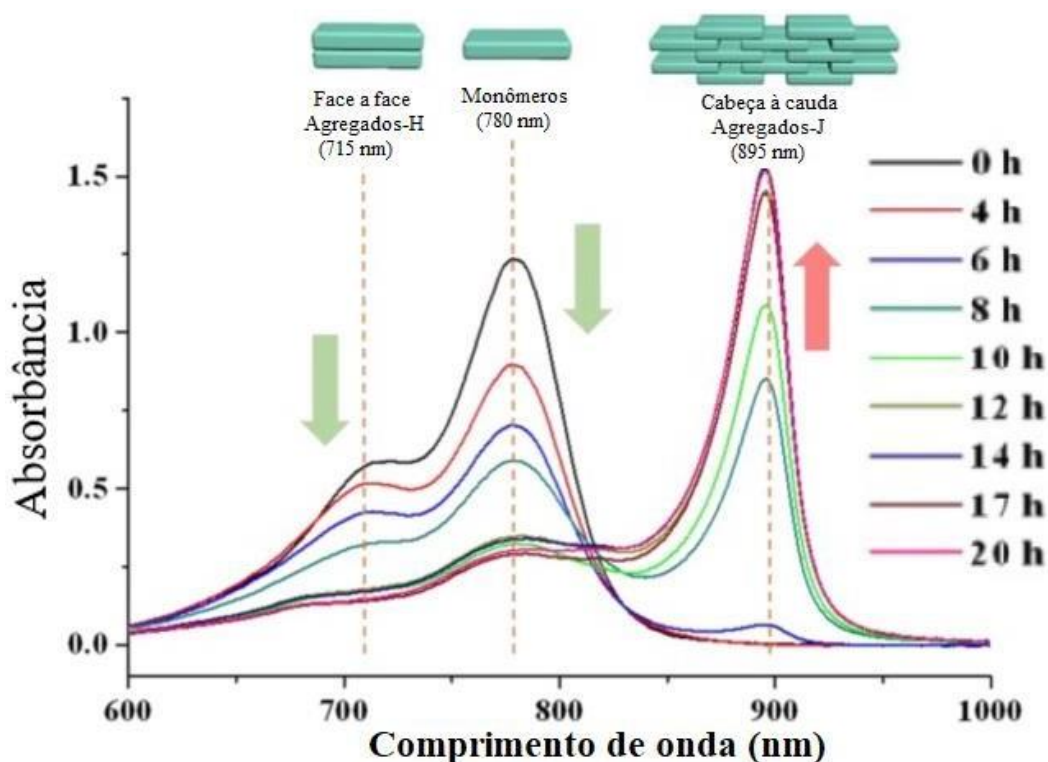


Figura 4 - Comportamento do espectro de absorção de luz da Indocianina Verde sendo aquecida a 65°C.

Fonte: Adaptada de LIU *et al.*(46)

A prevalência de uma banda no espectro óptico da ICG é determinado por diferentes características. Um exemplo é a concentração de sais na solução ou o aumento da concentração de ICG, que favorecem a banda com um máximo de absorção de luz de 715 nm. (44,48) A concentração da solução de ICG também influencia em suas propriedades de fluorescência. O aumento na concentração da ICG acima de 2 $\mu\text{g/mL}$ resulta no início de um fenômeno chamado de *quenching* molecular, em que há a diminuição da fluorescência da molécula. (49) Esse *quenching* pode acontecer por uma variedade de motivos, entre eles o processo de desativação do estado excitado do fluoróforo através do contato com outras moléculas. (45-46,48)

Assim sendo, a ICG está sujeita a se rearranjar em diferentes formas de agregados, como agregados-H, agregados-J, oligômeros, entre outros. (44,46) Além disso, a ICG quando estocada em soluções aquosas, passa por processos de degradação e formação de leucoformas com perdas de sua fluorescência. (49) Essa degradação é influenciada tanto pela concentração de estoque da molécula quanto por fatores como exposição à luz e solvente utilizado. (44,49–51) Entre os processos de degradação da ICG se encontra a dimerização da molécula. (51)

1.3.1 Dimerização da Indocianina Verde

A ICG está sujeita a se degradar por três distintos caminhos gerando os subprodutos apresentados na Figura 5. Quando em solução aquosa a ICG se altera por diferentes caminhos de acordo com fatores como a temperatura, o solvente, a concentração da molécula, o tempo, a presença de luz e oxigênio. O primeiro refere-se à fragmentação da cianina na presença de oxigênio singlete gerando moléculas contendo grupos carbonila através da cicloadição. O segundo, menos comum, ocorre com a truncagem da ICG de uma heptametina para uma pentametina. (51) Já no terceiro caminho, elucidado em 2019, a molécula passa por um processo de dimerização oxidativa. (50-51) Os dímeros de ICG (dICG) formados são considerados produtos de degradação da molécula por diferentes autores. (43,51,52)

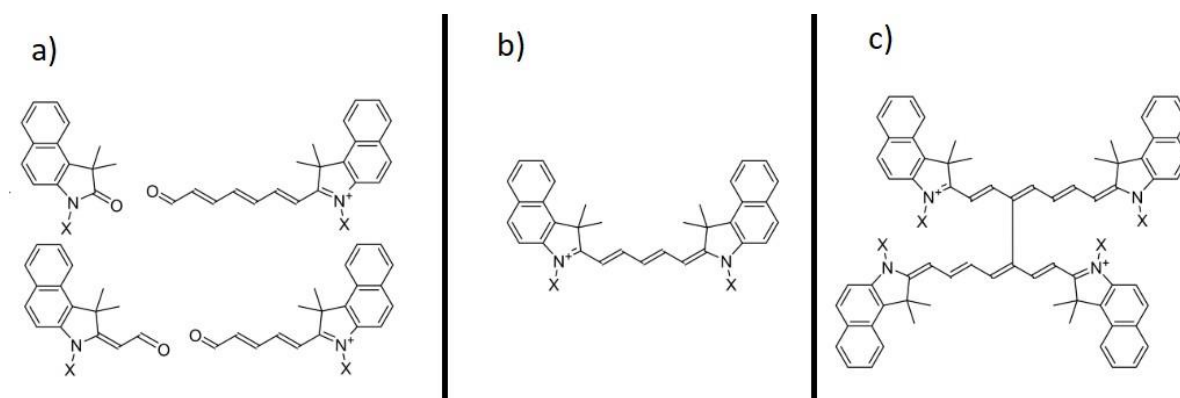


Figura 5 – Subprodutos da degradação da ICG em s) fragmentos contendo carbonila, em b) pentametina truncada e em c) dímero oxidativo

Fonte: Adaptada de LI; SMITH. (51)

Para que a dimerização da ICG ocorra, é necessário que alguns fatores estejam adequados. Espécies reativas de oxigênio como H₂O₂ e oxigênio singlete (¹O₂) promovem a degradação da cianina, e antioxidantes como azidas e ascorbato dificultam esse processo. Em baixas concentrações, em que a molécula se encontra pouco agregada, ocorre o processo predominante de degradação por cicloadição da ICG. Contudo, a concentração de estoque em

solução aquosa da molécula é um fator importante na sua degradação. Em altas concentrações de estoque de solução da ICG, como entre 1 mM e 2,5 mM, ocorre uma degradação menos intensa da mesma devido a fatores como aumento da densidade óptica da molécula e sua agregação, que dificultam os mecanismos de interação com a luz que causam a fotodegradação. (51)

Em altas concentrações, a ICG se encontra em um estado de predominância de agregados-H, que, durante a degradação da molécula, favorecem o processo da dimerização ao invés da cicloadição da ICG. Isso ocorre porque nesse estado de agregação há maior dificuldade de acesso dos $^1\text{O}_2$ às ligações duplas de polimetina e um favorecimento à dimerização oxidativa da molécula. (51) Um mecanismo proposto no processo de dimerização da ICG é através da oxidação do composto com a perda de H_2 . Quando dissolvida em metanol, é necessário a presença de luz e oxigênio nesse processo para que haja a formação de oxigênios singletos e ocorra a dimerização da ICG (50-51). O processo químico está mostrado na Figura 6. (51)

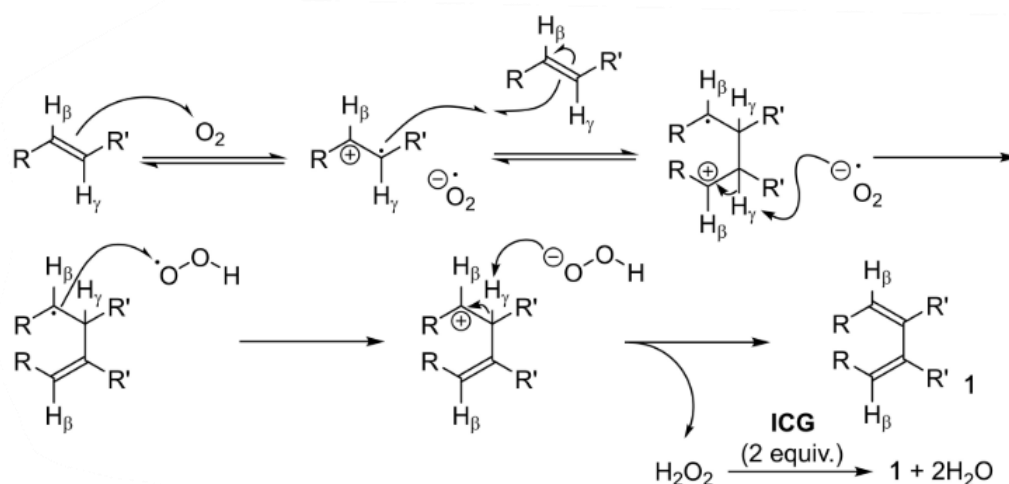


Figura 6 - Processo proposto na dimerização da ICG em metanol com a ação de oxigênios singletos.

Fonte: LI; SMITH. (51)

Existem dados na literatura quanto a características como peso molecular, intensidade de fluorescência, espectro de absorção óptico e afinidade a albumina da dICG. A massa molar do dímero foi encontrada como sendo 1502,57 g/mol, quando estão sem seus cátions de sódio. (52) Além disso, foi observado, em amostras de mesma densidade da ICG, que esses dímeros possuem uma fluorescência de aproximadamente 1% de intensidade da ICG monomérica e um espectro de absorção de luz em torno de 50% menos intenso para uma amostra de mesma densidade. (50-51) Ademais, devido a sua mudança de carga e variação conformacional, como

mostra a Figura 7, a afinidade por albumina da dICG é de aproximadamente 11,7 vezes menor do que da ICG. (51) Contudo, sendo a dICG considerada um produto de degradação da ICG (43,51), não há estudos na literatura sobre qual o seu potencial fototérmico e fotodinâmico.



Figura 7 - Estrutura da ICG e do dímero de ICG.

Fonte: Adaptada de LI; SMITH. (51)

No intuito de superar problemas da dimerização da ICG em solventes aquosos e ainda outros como fotoestabilidade reduzida da molécula (46,49), alta afinidade às proteínas plasmáticas causando rápida excreção pelo seres humanos e sua agregação(53), emprega-se o uso da nanotecnologia em conjunção com a ICG. (29,32,46,54)

1.4 Nanotecnologia

A nanotecnologia vem sendo utilizada para melhorar a eficiência de diversas moléculas envolvidas tanto com a PTT quanto a PDT. Essa tecnologia em escala nanométrica busca driblar os problemas específicos relacionados a cada molécula, entre eles, a agregação e degradação, focando na estabilidade do fármaco, além de otimizar o processo de entrega para o tecido alvo. (18)

O uso de nanopartículas (NPs) para PDT e PTT, vem mostrando grandes vantagens para uma maior eficiência terapêutica. Entre as vantagens se encontram o maior acúmulo no tumor devido a maior área superficial da NP, melhora da seletividade ao tumor e aumento dos efeitos de retenção e permeabilidade. (55-56) Além disso, as nanopartículas podem evitar a interação do FS/AF com os componentes plasmáticos e ainda se aliar a outros fármacos, permitindo um tratamento combinado. (56-57) Ademais, podem ser feitas modificações na superfície das NPs, em busca da melhora de sua biodistribuição e *uptake* celular tumoral, e assim, de um tratamento mais eficiente. (55–58) Especificamente para a PTT, a nanotecnologia vem se mostrando eficaz ao conseguir produzir nanopartículas com alta eficiência de conversão fototérmica (PCE, do inglês *photothermal conversion efficiency*). (29)

Existem tanto nanopartículas orgânicas quanto inorgânicas que podem ser utilizadas nas terapias fotônicas. (29) As nanopartículas inorgânicas, que apesar de poderem demonstrar um potencial de toxicidade em sistemas biológicos e um caráter não biodegradável, possuem vantagens como a de normalmente apresentar alta fotoestabilidade, alta capacidade de produção de calor e absorção da luz em comprimentos de onda no IVP. Com isso elas vêm sendo usadas desde os primeiros experimentos de PTT e são baseadas em materiais como o ouro, óxidos metálicos, na sílica, entre outros. (29,59) Já as NPs orgânicas, que são mais suscetíveis a instabilidade, mostram menor PCE e maior complexidade na síntese do que as inorgânicas, são mais interessantes em relação ao uso *in vivo* devido a sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. As NPs orgânicas podem ser baseadas em diversos materiais, entre eles as de matriz polimérica, as lipídicas (como nanoemulsões e lipossomas), os porfissomas, entre outras. (29,59–61)

Existem uma série de compostos fotoativos que são aliados às NPs. Entre eles estão as porfirinas, AFs baseados em proteínas, polímeros conjugados e corantes que absorvem luz no infravermelho próximo. A ICG é uma molécula que vem sendo utilizada tanto conjugada com nanopartículas inorgânicas, quanto com nanopartículas orgânicas, como lipossomas, nanomicelas, nanoemulsões entre outras. (29,33,59) Além disso, é possível realizar mudanças nas superfícies das nanoestruturas como a conjugação das moléculas da interface da nanoformulação com polietilenoglicol (PEG). (29,59) Essas conjugações visam superar fatores, como o caráter instável da molécula em meios aquosos. (29,49,59)

Estudos pré-clínicos da ICG aliados à nanotecnologia sobre cinética, fluorescência, PDT e PTT vem sendo feitos em tumores de modelos animais. (40,62,63) Até o ano de 2019, 225 estudos com nanopartículas na área de oncologia chegaram a testes clínicos, sendo 2 desses testes feitos com a ICG conjugada a nanopartículas. (40) Em 2020, os estudos clínicos de nanopartícula de ICG eram 4, mostrando benefícios no uso de nanoformulações ao diminuir o risco de alterações de propriedades ópticas da cianina, aumentar o acúmulo tumoral da molécula melhorando o sinal de fluorescência no local desejado. Contudo, ainda há lacunas grandes existentes entre o número de estudos *in vivo* e estudos clínicos nanoestruturas de ICG. (62)

1.5 Nanoemulsões

Um tipo de nanopartícula orgânica são as nanoemulsões, que são uma dispersão bifásica de dois líquidos imiscíveis, podendo ser uma mistura de água em óleo (A/O) ou de óleo em água (O/A), com gotículas estabilizadas por um surfactante. Os surfactantes funcionam de

modo a reduzir a tensão superficial e evitar a agregação das gotículas. (64) As vantagens relacionadas ao uso das nanoemulsões são, especialmente, por proteger os componentes em seu interior da degradação, e por ajudar a aumentar a solubilidade do fármaco. (34,64-65) Além disso, as nanoemulsões podem melhorar a taxa de internalização celular do fármaco ao alvo em relação ao fármaco livre, promovendo uma entrega de quantidade mais elevada da molécula, são capazes de aprimorar a solubilidade e biodisponibilidade da substância desejada, tudo isso contribuindo para um resultado mais eficiente do tratamento. (34,64) Outras vantagens para o uso das nanoemulsões são o uso de óleos biocompatíveis e até benéficos ao uso *in vivo*, assim como o preço reduzido ao se ter a possibilidade do uso da água como solvente. (64-65)

As nanoemulsões vêm sendo usadas para entrega de diferentes classes de fármacos como antimicrobianos, compostos bioativos, anticâncer, antirretrovirais, psicoativos, entre outros. (67) Apesar da nanoemulsão normalmente possuir a função de proteger o fármaco em seu interior, outro modo de se explorar essas nanoestruturas são com o uso do fármaco como o agente surfactante da nanoestrutura. Por exemplo, com base em um sal de porfirina, foi possível criar uma nanoemulsão em que o fotossensibilizador se agrupasse em agregados-J em sua interface, deixando um espaço em seu interior para que pudesse ser dopado com outros fármacos, como quimioterápicos. (68)

Contudo, existem desafios no uso da nanoemulsão para torná-las estáveis, uma vez que fatores como a temperatura e o pH podem influenciar em sua estabilidade. É necessário uma alta concentração de surfactantes não tóxicos como a caseína, polissacarídeos, sais biliares e Tween 20, 40, 60 e 80 para a formação da nanoemulsão. Ademais, substâncias que se fundem facilmente não são capazes de integrar uma nanoemulsão. (34,64)

A ICG é uma molécula já testada em conjunção com nanoemulsões. Os usos reportados na literatura normalmente são do corante no interior das nanoestruturas com o objetivo de melhorar características como a incorporação celular, estabilidade e cinética da molécula. (69–73) Alguns dos estudos da conjugação da ICG a nanoemulsões mostraram uma maior estabilidade da cianina de seu espectro de absorção óptico por 48 horas em 4°C e 37°C quando diluídas em água deionizada. (71) Além disso, foi constatado entre os estudos, maior fluorescência da nanoemulsão em tumores e regiões vasculares inflamadas em testes *in vivo* de murinos. (72-73) Apesar da literatura vem mostrando vantagens na conjugação da ICG a NPs para a melhoria da eficiência da molécula para terapias fotônicas(69–73), não há estudos reportados com nanoemulsão de ICG usando a própria molécula como surfactante, fato que será explorado neste trabalho.

1.6 Uma possibilidade contra o melanoma

No Brasil e no mundo, o câncer de pele é a neoplasia maligna mais comum entre todos os tipos de tumores. Só no Brasil, há uma estimativa de mais de 180.000 novos casos todos os anos. (74) Mais especificamente para o caso do melanoma, foi constatado, em 2020, uma taxa de incidência de 4,03 novos casos a cada 100.000 habitantes para homens e 3,94 novos casos em 100.000 habitantes para mulheres. (75) Além disso, o melanoma é o tipo de câncer que cresce com a maior taxa anualmente. (76) Sendo cerca de 76% da população brasileira depende do sistema unificado de saúde (SUS), o sistema público do país, inclusive para tratamentos relacionados ao câncer de pele, a busca por opções de tratamentos que sejam baratos e eficientes impactam diretamente nos custos e na qualidade de atendimento dos pacientes. (77)

O melanoma cutâneo é responsável por 90% dos óbitos entre todos os tipos de câncer de pele, sendo o mais perigoso. É originado do melanócito e as chances de cura são altas caso seja detectado em estágios iniciais. (78) Contudo, é uma forma extremamente agressiva de câncer que leva pacientes a óbito devido ao seu poder metastático. Um dos motivos dessa capacidade de espalhamento tumoral se deve às mutações genéticas e alterações no microambiente tumoral como a superexpressão de metaloproteases. (76,79)

O método mais preciso e definitivo de se identificar o grau de invasão de um tumor é por biopsia excisional. Já para o tratamento, a remoção cirúrgica aliada à quimioterapia e radioterapia são os métodos mais comuns. Para realizar a ressecção tumoral é recomendável que se utilize margens de 0,5 cm a 2 cm além das margens visíveis do tumor para a ressecção. (80-81) Quanto à quimioterapia, os medicamentos utilizados são a temozolomida (TMZ), dacarbazina (DTIC), paclitaxel e componentes de platina, contudo, há menos de 20% de resposta ao uso de apenas uma dessas substâncias pelos pacientes. Já a radioterapia se utiliza de radiações no local do tumor para destruir células cancerosas, porém com efeitos colaterais ao paciente como fadiga, náusea, mudanças na pele, entre outros. (82)

Os tratamentos ópticos podem ser considerados tipos não convencionais de combate ao melanoma. Entretanto, existem desafios na aplicação de tratamentos envolvendo a luz, tal qual a PDT, contra este tipo de câncer devido a alta taxa do pigmento melanina no tumor, atrapalhando a difusão da luz, o sequestro melanossomal, as defesas contra o estresse oxidativo, defeitos nos caminhos apoptóticos e estimulação de neoangiogênese. (82)

Apesar das dificuldades das terapias fotônicas aplicadas contra o melanoma (82), estudos tanto *in vitro* quanto *in vivo* foram feitos com diversos AFs e FS. Entre eles estão ftalocianinas conjugadas a nanopartículas, verteporfirinas, nanopartículas a base de ouro, clorinas, ICG, entre

outros. (83) Além disso, existem meios de se atenuar o espalhamento da luz para a realização da PDT em modelos *in vivo* como com o uso de agentes clareadores ópticos (ACO). (84-85)

Assim sendo, para o uso mais efetivo das terapias fotônicas *in vivo*, é interessante o uso de adaptações para que a molécula apresente maior estabilidade (18,86-87). Um exemplo disso é o uso de nanomicelas de ICG por Mundra *et al.*, em camundongos com melanoma. Essas nanoformulações foram capazes de inibir o crescimento tumoral através da PDT em relação ao controle e a solução de ICG que mostraram contínuo aumento do melanoma após o tratamento com irradiação. (87). Além disso, estudos em modelo murino de melanoma cutâneo mostraram que a ICG conjugada a um hidrogel e aplicada de forma intratumoral é capaz eliminar tumores de melanoma através da PTT. (86)

O uso da ICG localizada na interface de uma nanoemulsão é pouco explorado na literatura. Sendo assim, este trabalho utiliza-se da propriedade anfifílica da ICG para formar a nanoemulsão de ICG (NanoICG), sendo uma nanoestrutura sem caracterização reportada na literatura. Sua síntese foi feita em colaboração com o laboratório do prof. Gang Zheng, da *University Health Network*, em Toronto, Canadá, que preparou as nanoemulsões utilizadas nos testes mostrados nessa dissertação.

Com isso, esse projeto teve como alvo principal estudar propriedades como estabilidade e caracterização para tratamentos fotônicos de uma nanoemulsão de ICG, assim como compará-la à ICG livre e ao dímero de ICG. Os testes incluíram PTT em modelos murinos de melanoma cutâneo.

2 OBJETIVOS

Caracterizar a Nanoemulsão de Indocianina Verde (NanoICG) quanto suas propriedades ópticas e térmicas para uso em terapias fotônicas assim como sua aplicabilidade e comparar com as formas livre e dimérica da ICG.

2.1 Objetivos específicos

-Caracterizar a Nanoemulsão de Indocianina Verde (NanoICG) quanto sua distribuição de tamanho médio, seu espectro de absorção óptico e sua estabilidade em diferentes solventes e condições de armazenamento.

- Análise da estabilidade molecular e coloidal da NanoICG em meios aquosos

-Caracterizar e comparar as propriedades de absorção de luz e fotodegradação da NanoICG com a ICG na forma dimérica e monomérica

-Caracterizar e comparar as propriedades fototérmicas em *phantoms* e modelos de melanoma cutâneo murino *in vivo* da NanoICG com a ICG na forma monomérica e dimérica.

3 METODOLOGIA

3.1 Síntese da Nanoemulsão de Indocianina Verde (NanoICG)

A síntese das nanoemulsões de ICG foi realizada no Laboratório do Professor Gang Zheng pela pesquisadora Juan Chen. Para sintetizar a NanoICG, a ICG foi diluída na concentração de 4 μmol em 200 μL de uma mistura de metanol e clorofórmio na proporção 1:1 (v/v) e, após isso, adicionou-se mais 300 μL de clorofórmio. Em seguida, em um tubo de ensaio de vidro contendo 1 mL de clorofórmio e 20 μL de trioctanoato de glicerol, foi adicionada a mistura com ICG e submetida a uma atmosfera de nitrogênio (N_2) para secagem, por aproximadamente 30 minutos, até que se formasse um filme no tubo de ensaio. Após a formação do filme, o tubo de ensaio foi submetido ao vácuo por 2 horas para completar a secagem. Para dissolver o filme, foi colocado 2 mL de água destilada (H_2O) no tubo de ensaio contendo o filme e o mesmo foi submetido ao Bioruptor® (Diagenode, EUA) na frequência de 30 kHz, a 40°C e por 30 ciclos (30 segundos ligado e 30 segundos desligado por ciclo).

3.2 Extração dos dímeros de ICG (dICG)

Os dímeros da ICG (dICG) foram extraídos com a mistura na proporção (1:1) da solução de NanoICG a 1,7 mg/mL, após 14 dias de sua síntese, com clorofórmio (Sigma-Aldrich, EUA). Colocou-se 2 mL da NanoICG em um tubo de ensaio de 10 mL e adicionou-se 2 mL de clorofórmio, onde a mistura foi agitada manualmente por 1 minuto e deixada estática, para decantação, por 2 horas. Foi possível identificar a separação da mistura em duas fases: a parte oleosa, mais densa e transparente estava na parte inferior do tubo de ensaio e o sobrenadante, uma fase esverdeada, onde a dICG se encontrava. O sobrenadante foi retirado da parte superior do tubo de ensaio com uma pipeta e recolocada em um tubo falcon de 15 mL. Após isso, o tubo falcon foi submetido a congelamento a -80°C, *overnight*. Com a amostra congelada, a amostra foi liofilizada com o equipamento LS3000 (Terroni Equipamentos Científicos, Brasil) durante 24 horas, na temperatura de - 45°C.

3.3 Molécula de ICG, NanoICG, dICG e diluições

A Indocianina Verde utilizada nos estudos foi a Indocianina Verde (Ophthalmos S.A, Brasil), de peso molecular 774,96 g/mol. As amostras utilizadas nos experimentos foram pesadas do estoque em alíquotas de 1 mg em pó. Para o uso da molécula, houve a diluição das

alíquotas de 1 mg em 1 mL de água destilada (H₂O). Após a diluição em 1 mL, a amostra estava apta a ser diluídas em diferentes solventes como metanol e Tampão fosfato-salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*).

As amostras de NanoICG e dICG foram estocadas em solução aquosa nas concentrações de 2,4 mg/mL e 1,7 mg/mL a 4°C. Para as sucessivas diluições em PBS, metanol e água destilada, as amostras foram diluídas diretamente da solução estoque.

3.4 Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS)

Para medir o tamanho médio da NanoICG foram feitos testes no equipamento de DLS Malvern Zetasizer Nano ZS90 (Malvern panalytical, Reino Unido) com laser vermelho de 633 nm e um ângulo de espalhamento de 90°. As amostras foram diluídas na concentração de 20 µM e a absorbância foi medida em 633 nm pelo espectrofotômetro Hitachi u-2900. Após isso, foi feita a medida em triplicata do diâmetro hidrodinâmico da amostra no equipamento de DLS utilizando a absorbância encontrada.

3.5 Cromatografia líquida de alta performance (HPLC)

Para verificar a estabilidade da ICG na sua forma de nanoemulsão e sua forma livre, foram feitos testes com cromatografia líquida de alta performance (HPLC, do inglês, *High Performance Liquid Chromatography*) modelo Accela 1250 Pump aliado a um espectrômetro de massas modelo TSQ Quantum Access do Instituto de Química de São Carlos (IQSC), realizados em parceria com o pós doutorando Vinicius Guimarães Ferreira. A coluna de fase reversa utilizada foi do modelo Accucore C18 com tamanho de partícula 2,6 µm, comprimento de 150 mm e diâmetro de 2,1 mm. Os testes foram feitos com a ICG diluída para o uso em H₂O e com a ICG extraída da nanoemulsão por liofilização. As amostras utilizadas foram diluídas na concentração de 100 ppm. Os dados foram obtidos utilizando o modo positivo de detecção do aparelho e com os parâmetros apresentados na Tabela 1 e o método de aquisição mostrado na Tabela 2.

Tabela 1 – Parâmetros utilizados nas análises da ICG no HPLC

Tempo (min.)	%Água (Acetato NH₄ 0,1M pH 5,4)	% ACN (puro)
0	70	30
5	70	30
17	10	90
20	10	90
25	70	30

Fonte: Elaborada por Vinicius Guimarães Ferreira

Tabela 2 - Método de aquisição da ICG

MÉTODO	ICG
Fluxo	350 µL/min
Temperatura da Coluna (°C)	25
Volume da Injeção	20 µL (injeção manual)
Picos de Interesse (Minutos)	9,5 e 10,5
Massas	3,5 KV
Sheath Gas	15 u.a. auxiliar gas
Temperatura Capilar (°C)	350
Espectro de Massa	300 – 2000 m/z escaneamento completo
Tempo de Escaneamento (Segundos)	0,529

Fonte: Elaborada por Vinicius Guimarães Ferreira

3.6 Caracterização do espectro de fluorescência

Para a caracterização óptica das nanoemulsões, foi utilizado o espectrofotômetro Cary 50-Varian Bio UV-Vis. Todas as medidas foram feitas em cubetas de plástico de 1 cm de caminho óptico e variando-se o comprimento de onda entre 300 e 1000 nm. Para a caracterização do espectro de fluorescência das nanoemulsões, foi utilizado o espectrofotômetro de fluorescência Cary Eclipse Agilent. As amostras foram excitadas em 770 nm ou 780 nm e a emissão foi aferida na região entre 790 nm e 900 nm.

3.7 Caracterização do espectro óptico em meios aquosos com alterações de temperaturas e solventes

3.7.1 Estabilidade da NanoICG em mistura de solventes

A nanoemulsão de ICG foi submetida a misturas de solventes, PBS com metanol ou PBS com H₂O. Para verificar a estabilidade do seu espectro de absorção óptico, foram feitas medidas de sua absorbância a cada 1 minuto, durante 15 minutos.

3.7.2 Lei de Beer Lambert

As curvas de calibração da NanoICG e dICG em H₂O ou em metanol foram feitas através da equação de Beer-Lambert (Equação 1), onde A corresponde ao valor de absorbância, obtido com o espectrofotômetro, ε é coeficiente de extinção molar, c corresponde à concentração molar e l é a distância do caminho óptico.

$$A = \varepsilon cl \quad (1)$$

O parâmetro buscado foi o coeficiente de extinção molar ε e, para isso, a concentração das amostras, c , foi variada nos valores de 0,05 μM , 0,5 μM , 1 μM , 1,5 μM , 2 μM , 2,5 μM , 3,5 μM e 5 μM , a partir da solução de nanoICG e da solução de dICG. Esses valores foram correlacionados com a absorbância óptica, A , em diferentes comprimentos de onda da amostra. A distância do caminho óptico, l , se manteve fixa em 1 cm, sendo ela o valor da largura da cubeta de poliestireno utilizada. As curvas foram feitas no intuito de obter a faixa de concentração de absorção de luz em que o espectro óptico da NanoICG e a do dICG variavam linearmente em relação à concentração utilizada.

3.7.3 Termoestabilidade do espectro de absorção óptico em diferentes solventes

Para caracterizar e comparar a estabilidade e termoestabilidade óptica da NanoICG, dICG e ICG, as amostras foram diluídas na concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ e no volume de 3 mL tanto em PBS quanto em H₂O em *eppendorfs* de 5 mL. Os *eppendorfs* contendo a amostra foram mantidos isolados da luz com o uso de papel alumínio e foram estocados em temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C por 24 horas. As medidas de caracterização óptica foram feitas imediatamente após a diluição e 24 horas.

3.8 Equipamentos de iluminação

Para testes de fotodegradação em $\lambda = 780 \text{ nm}$ e $\lambda = 808 \text{ nm}$ foram utilizados dispositivos de laser contínuo chamados de *lasertable*, fabricados no Laboratório de Apoio Tecnológico (LAT)

do Instituto de Física de São Carlos conforme mostra a Figura 8-a. Cada dispositivo contava com 18 lasers que focalizavam em uma área central de irradiação em que uma cubeta de poliestireno foi posicionada. O equipamento com lasers em $\lambda = 780$ nm possui uma irradiância de $62,2 \text{ mW/cm}^2$ em seu ponto central e o equipamento de 808 nm possui uma irradiância no centro de iluminação de $119,3 \text{ mW/cm}^2$.



Figura 8 – Equipamentos de iluminação utilizados, sendo em a) a lasertable de 808 nm irradiando uma amostra e em b) uma biotable de 850 nm com seus LEDs.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para a fotodegradação em 850 nm, foi utilizado outro dispositivo, com um arranjo de 24 LEDs também fabricado pelo LAT-IFSC chamada de *biotable*, como mostra a Figura 8-b. Para a iluminação das amostras, foi necessário diluí-las em um poço de uma placa de 24 poços e assim realizar a iluminação. Cada LED teve sua irradiância aferida, sendo a média em torno de 30 mW/cm^2 , mostrando uma distribuição relativamente homogênea da luz em sua superfície. O LED do poço utilizado nos experimentos possuía uma irradiância de $32,8 \text{ mW/cm}^2$.

Para irradiações em alta potência, foi utilizado um laser da marca MMOptics (São Carlos, Brasil) de máximo de 7 W de potência e emissão de luz em $\lambda = 810$ nm, ligado à uma fibra óptica para a entrega da luz na posição desejada.

3.9 Fotodegradação

3.9.1 Fotodegradação da NanoICG com variações de solventes e irradiações

Para determinar o tempo de irradiação de cada amostra, foi feito um cálculo do número de fótons absorvidos pelas moléculas da solução, a cada iluminação. O número de fótons

absorvidos pela amostra em cada irradiação foi de 1×10^{19} fótons/cm³. Este valor é o suficiente para realização de terapias fotônicas como a PDT. (88)

Para calcular os fótons emitidos (E_f) pela fonte de luz, foi utilizada a equação 2 em que I_λ é a irradiância no comprimento de onda utilizado, λ o comprimento de onda, h a constante de Planck e c a velocidade da luz.

$$E_f = \frac{I_\lambda \lambda}{hc} \quad (2)$$

Já para calcular os fótons absorvidos pela amostra (A_f), foi utilizada a equação 3, em que $\mu_a(\lambda)$ é o coeficiente de absorção da molécula no comprimento de onda excitado.

$$A_f = \mu_a(\lambda) E_f \quad (3)$$

Para o cálculo do tempo de excitação (It) das amostras foi utilizada a equação 4, levando em conta que o número de fótons absorvidos pela amostra por iluminação foi de 1×10^{19} fótons/cm³.

$$It = \frac{1 \times 10^{19}}{A_f} \quad (4)$$

As amostras iluminadas pela *lasertable* possuíam maior precisão quanto ao cálculo do número de fótons absorvidos devido a menor variação do comprimento de onda da luz emitida em relação à fonte que utilizava o LED (*biotable*).

As amostras foram diluídas tanto em PBS quanto em água destilada na concentração de 3,9 µg/mL antes do início da *fotodegradação*.

3.9.2 Fotodegradação em 1W/cm² e 810 nm

Com a utilização do laser de 7 W em $\lambda = 810$ nm, foi feita a iluminação das amostras diluídas no volume de 1 mL em uma cubeta de poliestireno a uma distância de 3,3 cm de distância do laser promovendo uma irradiância de 1 W/cm² na face da cubeta contendo a amostra, sendo a aferição de irradiância feita com um medidor de potência. As diluições da NanoICG, dICG e ICG foram feitas nas concentrações de 3.9 e 156 µg/mL µM, tanto em PBS quanto em H₂O. O diâmetro de irradiação do laser a essa distância na cubeta foi de 1,6 cm (LabMax-TOP, Coherent, EUA).

Cada iluminação das amostras durou 100 s, com a entrega de 100 J/cm² de fluência de luz. As irradiações foram feitas por 6 vezes, totalizando uma entrega de 600 J/cm² por amostra, a cada teste de fotodegradação.

A fotodegradação da amostra foi medida no espectrofotômetro, após a diluição da solução e depois de cada sucessiva iluminação. Para amostras diluídas em 156 µg/mL, houve diluição de 40 vezes para adequar a concentração da amostra à sensibilidade do espectrofotômetro.

3.10 Medidas de temperatura

Para a captação de imagens de calor dos experimentos realizados foi utilizada a câmera termográfica FLK-Ti400 (Fluke, EUA), padronizada a aproximadamente 1 metro de distância das amostras, durante os experimentos envolvendo a fototerapia.

Para aferir a variação de temperatura em pontos específicos das amostras foi utilizada uma agulha térmica intradérmica, *needle thermocouple, 29 gauge, T-type* (National Instruments, Hungria). Essa agulha possui um sensor que pode ser inserido em superfícies para a medida da temperatura local.

3.11 Testes de potencial fototérmico e de fotoestabilidade com ciclos de irradiação periódicos

Foi medido o aumento de temperatura das amostras de NanoICG e ICG diluídas no volume de 1 mL em cubetas de poliestireno na concentração de 156 µg/mL em H₂O ou H₂O com 0,1 % de Triton X-100 quando submetidas a uma irradiação de 1 W/cm² e $\lambda = 810$ nm por 10 minutos. Foi aferida a mudança de temperatura causada por ciclos de irradiação em cubetas contendo amostras de NanoICG e ICG. As amostras foram diluídas na concentração de 39 µg/mL no volume de 1 mL de H₂O ou 1 mL de H₂O com 0,1% de Triton X-100 em cubetas de poliestireno. Os ciclos consistiram em 7 períodos de 9 minutos totalizando 63 minutos. A cada ciclo o laser permaneceu ligado por 3 minutos irradiando a amostra com 1 W/cm² e 810 nm e 6 minutos desligado. Os períodos do laser ligado e desligado foram intercalados. Para medir a variação de temperatura das amostras durante os ciclos foi utilizada a câmera termográfica, sendo as imagens termográficas captadas a cada 15 segundos. Além disso, foi aferido o espectro de absorção óptica das substâncias antes e depois desses ciclos.

3.12 Phantoms térmicos

3.12.1 Fabricação dos Phantoms

Os *phantoms* de albumina produzidos foram feitos usando como molde seringas de 3 mL, com 8 mm de diâmetro. As soluções foram preparadas misturando 490 μL de albumina (Health Labs, Brasil) na concentração de 11,852 g/L, 300 μL de solução Bis-Acrilamida (40%) (Sigma-Aldrich, EUA), 100 μL de tris-hidroximetil aminometano (Synth®, Brasil) na concentração de 1 M e pH 7,0, 100 μL da amostra de ICG, dICG e NanoICG com concentração 10 vezes maior do que a final desejada, 8,4 μL de persulfato de amônia (Synth®, Brasil) e 2 μL de tetrametiletilnodiamina (Neon comercial, Brasil). No caso dos *phantoms* controle, o composto fotossensível foi substituído por 100 μL de PBS na formulação. Após isso, as soluções foram homogeneizadas e os suportes cilíndricos foram vedados com *parafilm* e cobertos com papel alumínio para impedir a fotodegradação dos compostos. Os *phantoms* foram deixados *overnight*, à temperatura ambiente, para que ocorresse sua polimerização.

3.12.2 Parâmetros de iluminação

Para os testes em *phantoms*, a fibra óptica do laser de 7 W foi posicionado a 2,5 cm de distância da amostra, sendo a irradiância no topo ajustada para 0,5 W/cm² ou 1 W/cm². O laser manteve-se ligado por 10 minutos seguidos. O aumento de temperatura da amostra foi medido com o uso da agulha intradérmica posicionada no topo do *phantom*, coletando a temperatura a cada 1 segundo. O aumento de temperatura também foi coletado nos períodos de 0s, 300s, 400s, 500s e 600s com a câmera termográfica. Na Figura 9 são mostrados o *phantom*, a posição da agulha intradérmica e a posição da fibra óptica irradiando toda a superfície da amostra.



Figura 9 - Phantom sendo irradiado com a agulha térmica acoplada.

Fonte: Elaborada pelo autor

3.13 Estudos em modelo de melanoma cutâneo murino

Todos os procedimentos animais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética no uso de animais (CEUA) do Instituto de Física de São Carlos sob o protocolo de número 5590171120. Foram utilizados camundongos da linhagem Balb/C nude, obtidos do biotério Central de Medicina da USP, unidade de São Paulo. Os animais utilizados possuíam aproximadamente 6 semanas de vida e um peso de 15 gramas. Para que a indução do melanoma fosse realizada, os animais foram injetados com células da linhagem B16F10 adquirida da *American Type Cell Collection* (ATCC) recebendo um volume de 30 μL com um total de 10^6 células, de forma intradérmica. Os animais foram acompanhados até que os tumores atingissem o tamanho entre 2,6 e 3 mm. O cuidado dos animais, assim como a injeção das células tumorais nos animais foram feitos pela aluna de doutorado Letícia Palombo Martinelli.

Os testes de terapia fototérmica foram realizados com a injeção intratumoral de NanoICG, dICG e ICG. Foi estimado o volume de cada tumor antes da injeção das amostras. Essa medida foi feita através de um cálculo com o diâmetro maior, menor e espessura do tumor. Com essas medidas, foi estimado através da fórmula do volume de uma elipse o volume tumoral. O volume injetado de solução foi o mesmo de cada volume tumoral estimado. O número total de animais utilizados foi de 14 animais e divididos segundo a tabela 3 para cada amostra.

Tabela 3 – Número de animais utilizados para cada amostra de experimento *in vivo*

Amostra	Nº de animais
ICG 156 $\mu\text{g/mL}$	2
NanoICG 156 $\mu\text{g/mL}$	6
NanoICG 78 $\mu\text{g/mL}$	3
dICG 156 $\mu\text{g/mL}$	3

Para aferir a variação de temperatura dos tumores, foram utilizadas a agulha intradérmica inserida no centro do tumor (mostrado na Figura 10), com aferição a cada 1 segundo, e a câmera termográfica a cada 100 segundos. A irradiação foi feita por 10 minutos com o laser de 810 nm e 0,5 W/cm^2 entregue na superfície do tumor. Todo o procedimento ocorreu com os camundongos anestesiados em anestesia inalatória com Isoflurano.

Para verificar as mudanças no aspecto tumoral antes e após o tratamento, foram captadas imagens dos animais no dia do tratamento e diariamente até 14 dias após a PTT. Os

experimentos de PTT foram realizados em parceria com a aluna de doutorado Leticia Palombo Martinelli.



Figura 10 - Camundongo preparado para o tratamento, com amostra injetada no tumor e agulha termográfica acoplada no mesmo.

Fonte: Elaborada por Letícia Palombo Martinelli

Para analisar os tumores que apresentaram recidiva após 14 dias do tratamento foi realizada a morte dos animais e a coleta do tecido, realizando a biópsia excisional de toda a porção danificada, com uma margem de tecido normal.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Espalhamento dinâmico de luz (DLS)

Para identificar a distribuição do diâmetro da NanoICG formada, assim como seu tamanho médio, foram feitas medidas com o uso da técnica de DLS. O gráfico da Figura 11-a representa a distribuição do tamanho, em nanômetros, do diâmetro das nanoemulsões pela sua frequência, em porcentagem. Além disso, para identificar a homogeneidade da amostra, foi aferido seu índice de polidispersão (PDI), que, em valores menores que 0,2, indica uma distribuição homogênea e restrita das nanopartículas. (89-90) O valor de PDI obtido foi de 0,111, como mostrado na Figura 11-b e, portanto, mostra uma distribuição homogênea do tamanho da NanoICG.

Em relação ao diâmetro da nanoemulsão, houve um máximo de frequência no valor de 202,7 nm, que ocorre em aproximadamente 15% do total da amostra e o tamanho de diâmetro médio foi de 179,3 nm. O tamanho médio da NanoICG está em uma faixa adequada ao uso *in vivo*, uma vez que nanopartículas com diâmetros entre 30 e 200 nm possuem a característica de acumular com mais eficiência em tumores e de permanecer por mais tempo na corrente sanguínea. (31) Isso ocorre pois NPs com um diâmetro menor que 10 nm extravasam por capilares sanguíneos normais. Já os capilares sanguíneos de tumores possuem aberturas maiores, entre 100 nm e 500nm, propiciando o extravasamento das NPs no local desejado. (91)

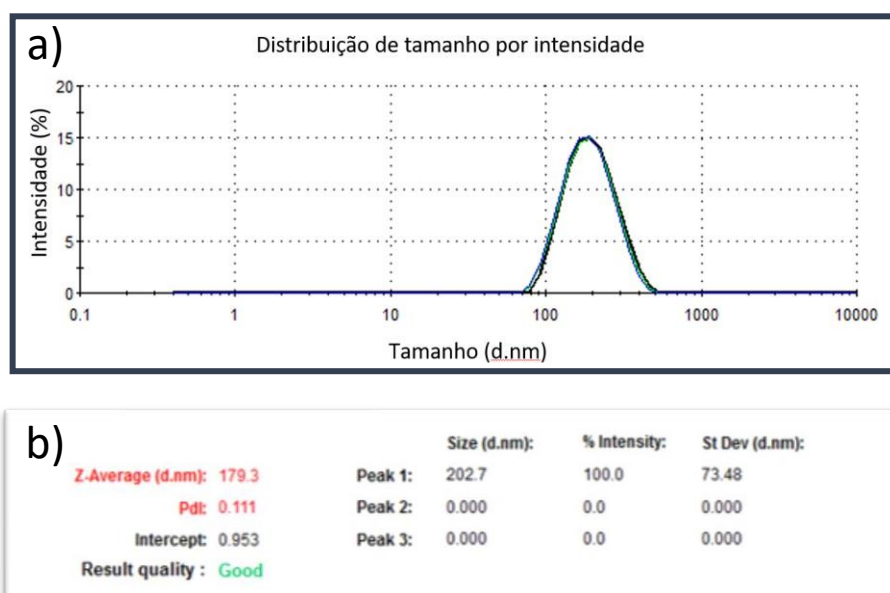


Figura 11 - Em a) distribuição do tamanho dos diâmetros em nanômetros da NanoICG recentemente sintetizada e em b) dados sobre a média do tamanho dos diâmetros da nanoemulsão, seu PDI, sua frequência máxima de diâmetro e a qualidade da triplicata.

Fonte: Elaborada por Juan Chen (traduzida)

Após 6 meses da síntese da nanoemulsão foram verificados novamente seus parâmetros de distribuição de tamanho e homogeneidade. Como mostrado no gráfico da Figura 12-a, houve um aumento de tamanho médio do diâmetro da nanoemulsão para 299,6 nm, sendo o diâmetro mais frequente encontrado de 314,7 nm, em aproximadamente 20% da amostra. O aumento do tamanho médio da nanoemulsão com a preservação de sua homogeneidade, pode ser explicado pelo fenômeno da coalescência. Esse fenômeno consiste na desestabilização da nanoemulsão, promovendo a junção de diferentes nanoestruturas em uma só. (92)

O PDI se manteve menor que 0,2, diminuindo para um valor de 0,03 (Figura 12-b), mostrando a homogeneidade da amostra. Essa homogeneidade após 6 meses é um fator positivo, uma vez que o tamanho variado da nanoemulsão pode afetar sua cinética *in vivo*. (31)

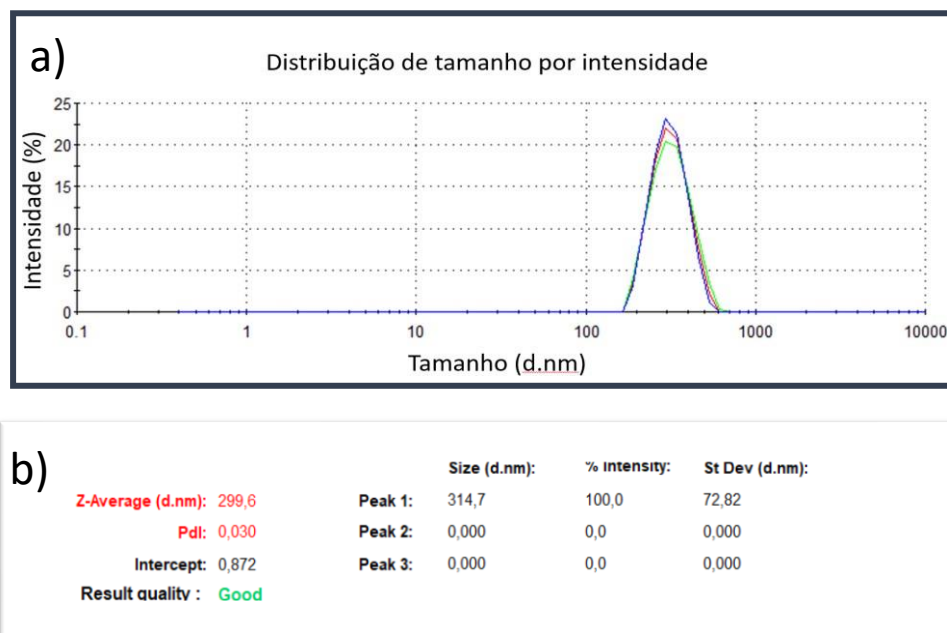


Figura 12 – Em a) distribuição do tamanho dos diâmetros em nanômetros da NanoICG após 6 meses da síntese e em b) dados sobre a média do tamanho dos diâmetros da nanoemulsão, seu PDI, , sua frequência máxima de diâmetro e a qualidade da triplicata.

Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar da estabilidade da NanoICG quanto sua homogeneidade, foi preciso analisar as características da ICG presente na nanoemulsão, uma vez que a cianina em contato com soluções aquosas, como no caso da NanoICG, sofre processos de degradação. (43,50) Sendo assim, foram feitos testes por HPLC, com intuito de caracterizar a estabilidade da molécula.

4.2 Cromatografia líquida de alta performance

Para estudar as propriedades das moléculas presentes na NanoICG, foi feita a extração, segundo a seção 3.2 da metodologia, com o uso de clorofórmio da ICG em diferentes dias, após sua síntese, para análises por HPLC. Essa técnica é utilizada para separar e identificar diferentes compostos presentes em uma amostra, dependendo de seu tempo de retenção no aparelho, levando-se em conta aspectos da como massa molecular, absorbância e fluorescência. (93) Os experimentos foram realizados em parceria com a *University Health Network* (UHN), em Toronto, no Canadá e com o Instituto de Química de São Carlos (IQSC-USP).

A Figura 13 mostra os resultados coletados pelos testes de HPLC feitos na UHN. A Figura 13-a mostra que a ICG recentemente preparada possui dois picos de abundância relativa de moléculas, um correspondente a aproximadamente 3% da amostra, com um tempo de retenção de 2,75 minutos e outro correspondente a 97% da amostra, com um tempo de retenção de 2,96 minutos. Diferentes tempos de retenção no HPLC significam uma variação nas propriedades de massa molecular, polaridade e carga das moléculas da amostra. (94–96) Em a, b e c da Figura 13, foi possível observar que as amostras apresentavam 2 picos de maior intensidade, um com tempo de retenção entre 2,96 e 2,99 minutos, e outro tempo de retenção com valores entre 2,75 e 2,78 minutos. Na literatura, está descrito por Mindt *et al.* (2018) que a ICG recentemente preparada mostra dois tempos de retenção prevalentes com diferenças de aproximadamente 5% entre eles, sendo que para a molécula identificada no maior tempo de retenção são os monômeros de ICG. Já o menor tempo de retenção identifica os dímeros de ICG (dICG), que se formam com o tempo, por dimerização oxidativa, quando há diluição da ICG em soluções aquosas. (43) A dICG é uma molécula mais polar que a ICG e que possui um tempo de retenção em torno de 5% menor que sua forma monomérica, como mostrado no HPLC (43,51-52)

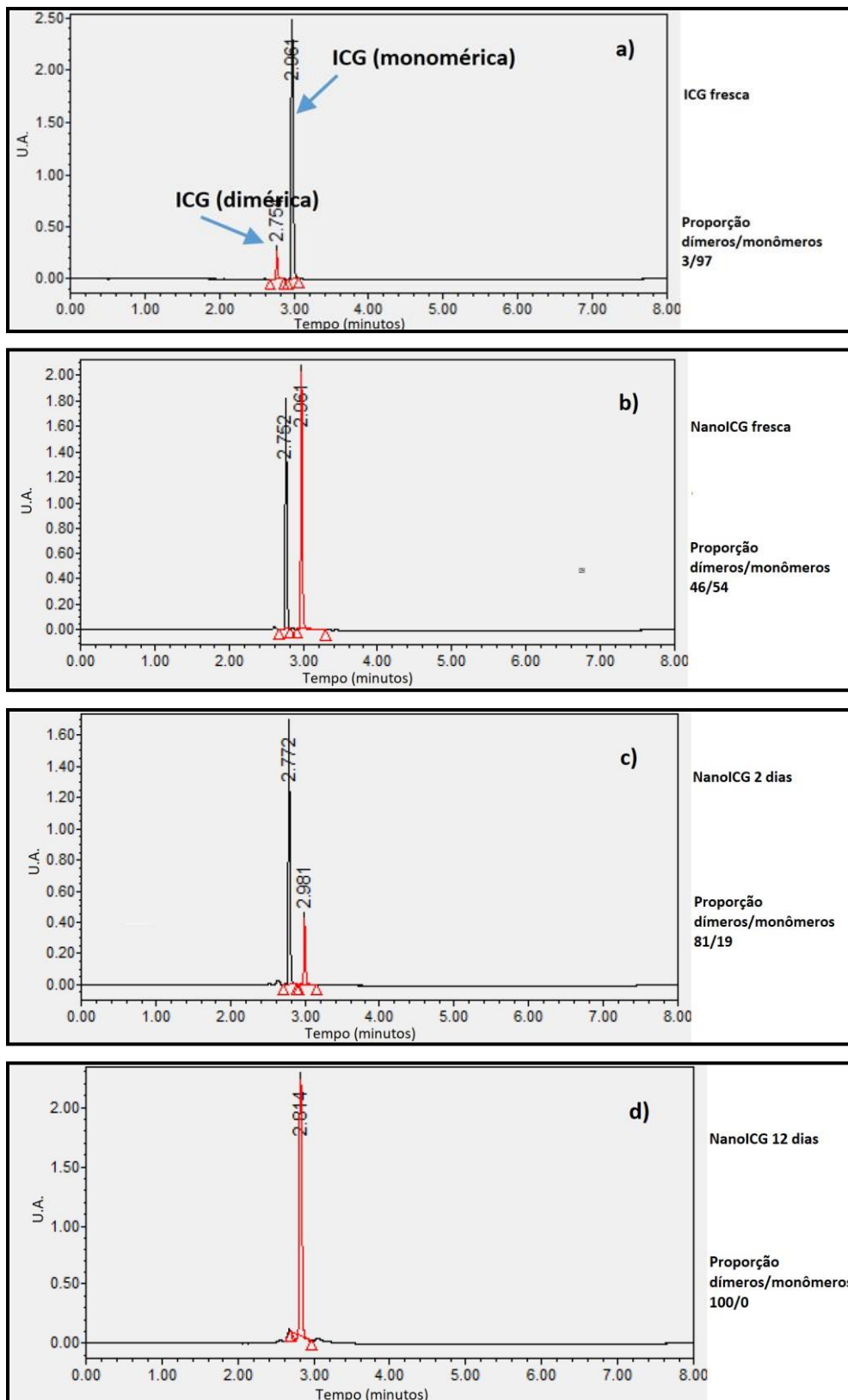


Figura 13 - Tempo de retenção em minutos em a) da ICG recentemente preparada, em b) da ICG extraída logo após a síntese da Nanoemulsão, em c), da ICG extraída 2 dias após a síntese da Nanoemulsão e em d) da ICG extraída 12 dias após a síntese da Nanoemulsão.

Fonte: Elaborada por Juan Chen (traduzida)

Dados coletados no HPLC imediatamente após a síntese da nanoemulsão (Figura 13-b), mostram um aumento na proporção da ICG em sua forma dimérica em relação a sua forma monomérica – com cerca de 50% de cada espécie. A aferição feita no aparelho após 2 dias de estocagem da nanoemulsão, na concentração de 2,4 mg/mL, mostra uma maior concentração de dICG na solução, em que cerca de 80% das moléculas da amostra se encontram na forma dimerizada, como mostrado na Figura 13-c. A Figura 13-d, mostra o resultado do HPLC feito 12 dias após a síntese da NanoICG, exibindo apenas um tempo de retenção prevalente, indicando uma dimerização da ICG presente na nanoemulsão. Segundo a literatura, a dimerização é um fenômeno que ocorre quando a ICG está estocada em soluções aquosas em concentrações maiores que 50 µg/mL. (43,51)

A NanoICG é formada por dICG, uma molécula com uma massa molecular de 1502,57 Da sem seus cátions de sódio, conforme mostrado na Figura 14. Como o propósito da nanoemulsão é de ser aplicada para terapias fotônicas, foi preciso caracterizar as propriedades ópticas dos dímeros de ICG, uma vez que não estão descritas de forma substancial na literatura. Apesar de haver a caracterização quanto sua fluorescência, que possui uma intensidade cerca de 100 vezes menor que a ICG, e seu espectro de absorção óptico, que apresenta bandas de absorção de luz similares à ICG, porém com intensidade menores, de aproximadamente 50% de quando na mesma molaridade, há poucas informações sobre suas propriedades de estabilidade, fotoestabilidade, fototérmicas e fotodinâmicas. (50-51)

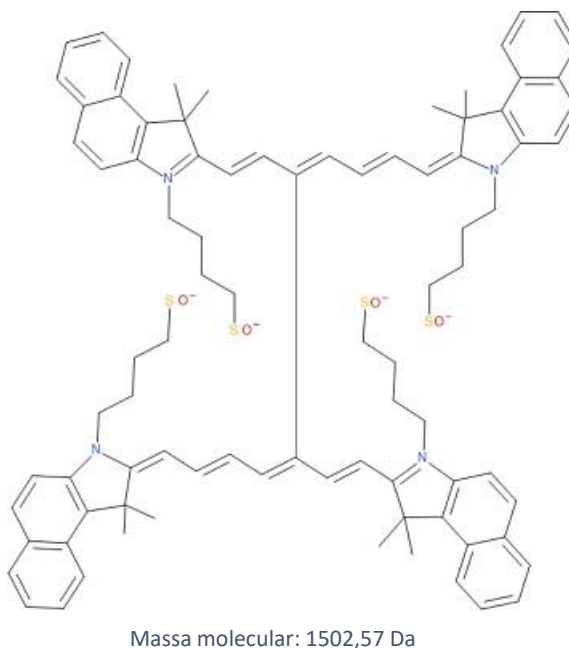


Figura 14 – Estrutura química da dICG sem seus cátions de sódio

Fonte: Elaborada pelo autor

Para obter a massa molecular dos tempos de retenção obtidos na Figura 15, foi feita a análise das massas em relação a carga (m/z) dos tempos de retenção prevalentes encontrados (Figura 15), que significa a divisão da massa molecular da molécula pelo número de cargas atreladas à mesma. Assim sendo, os valores dos picos apresentados na Figura 15-a e 15-b representam a massa molecular do composto dividido pelo número de íons carregados presentes na molécula. (97) A massa molecular da ICG desprotonada, sem seu cátion de sódio, é de aproximadamente 752,4 Da. Os valores da massa molecular encontrados na literatura da ICG submetida ao processo do HPLC são de aproximadamente 753,4 Da, pois há a protonação da molécula. (43,95) A Figura 15-a mostra a massa molecular da ICG, de acordo com o seu tempo de retenção maior encontrado no HPLC, com o valor de 753,75 Da, sendo esse valor próximo ao descrito na literatura para o monômero de ICG. A Figura 15-b mostra uma massa molecular referente ao pico de abundância de tempo de retenção menor, de 1503,44 Da. Esse valor é similar à massa reportada na literatura, porém com 1 Da de diferença, 1502,57 Da, sendo essa diferença devido à protonação da dICG encontrada no HPLC da Figura 15-b. (52)

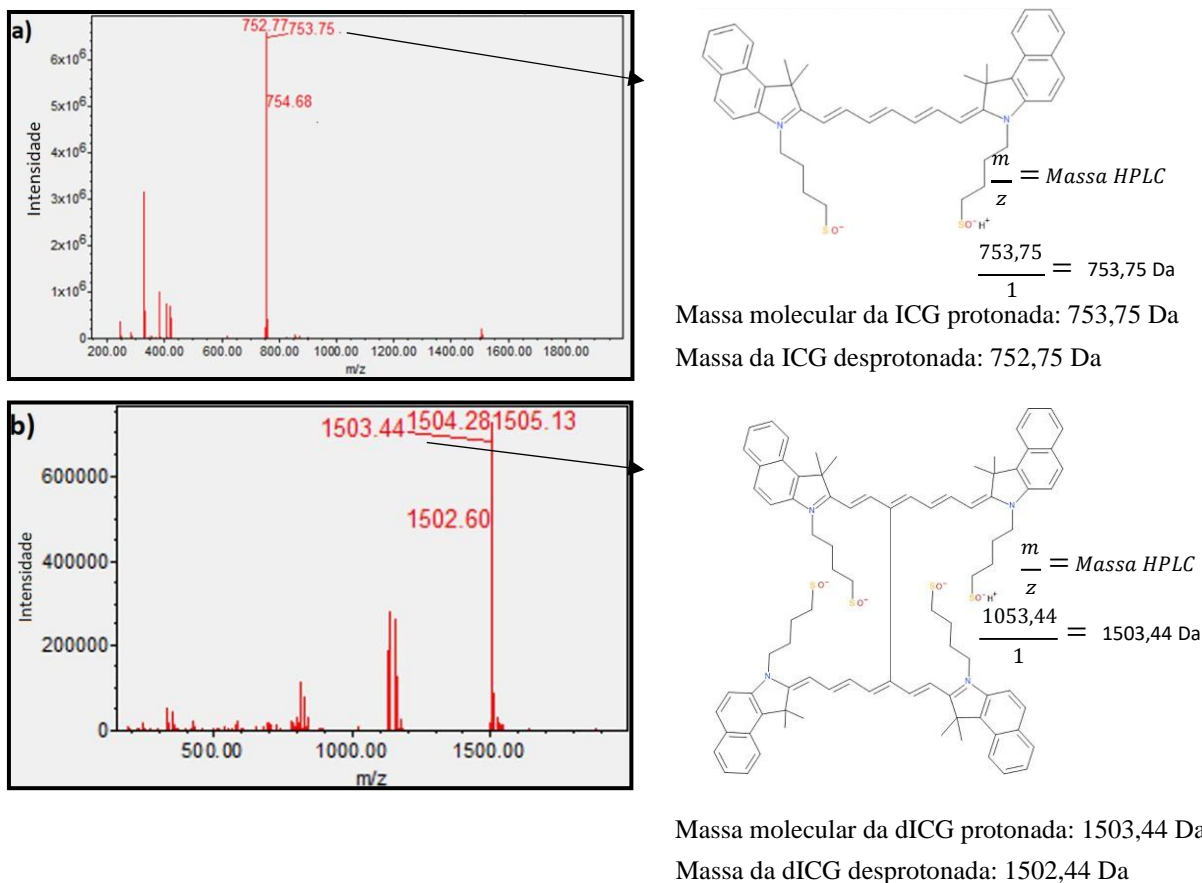


Figura 15 – Cromatograma do espectro de massas encontrados nos picos referentes aos tempos encontrados. Em a) encontra-se o espectro de massas referente ao pico de aproximadamente 3 minutos com a estrutura molecular da ICG ao seu lado e em b) encontra-se o espectro de massas referente ao pico de aproximadamente 2,8 minutos com a estrutura molecular da dICG ao seu lado.

Fonte: Elaborada por Juan Chen (traduzida) e pelo autor

As nanoemulsões sintetizadas no Canadá também foram estudadas quanto a estabilidade através do HPLC, no Brasil, em parceria com o IQSC. Sabendo-se que a ICG é uma molécula suscetível à degradação em meios aquosos, sensível a mudanças de temperatura, luz e concentração (43,49), houve a necessidade da caracterização da estabilidade das moléculas presentes na NanoICG após o processo de importação. As amostras de NanoICG estudadas no Brasil foram analisadas meses após sua síntese, com intuito de compreender se a ICG da nanoemulsão importada continuava na forma dimérica e por quanto tempo essa forma molecular permanecia estável.

Os dados do HPLC para a ICG recentemente preparada mostraram um tempo de retenção principal de aproximadamente 10,2 minutos, como mostra o gráfico da Figura 16-a, indicando sua forma monomérica. Além disso, foi encontrado um tempo de retenção secundário, de 9,31 minutos, com menor intensidade, indicando a ICG em sua forma dimérica

na amostra. Já a Figura 16-b mostra o HPLC da NanoICG 3 meses após sua síntese, em que se encontra apenas um pico de tempo de retenção principal com o valor de 9,34 minutos, indicando uma dimerização completa das cianinas presentes na nanoestrutura.

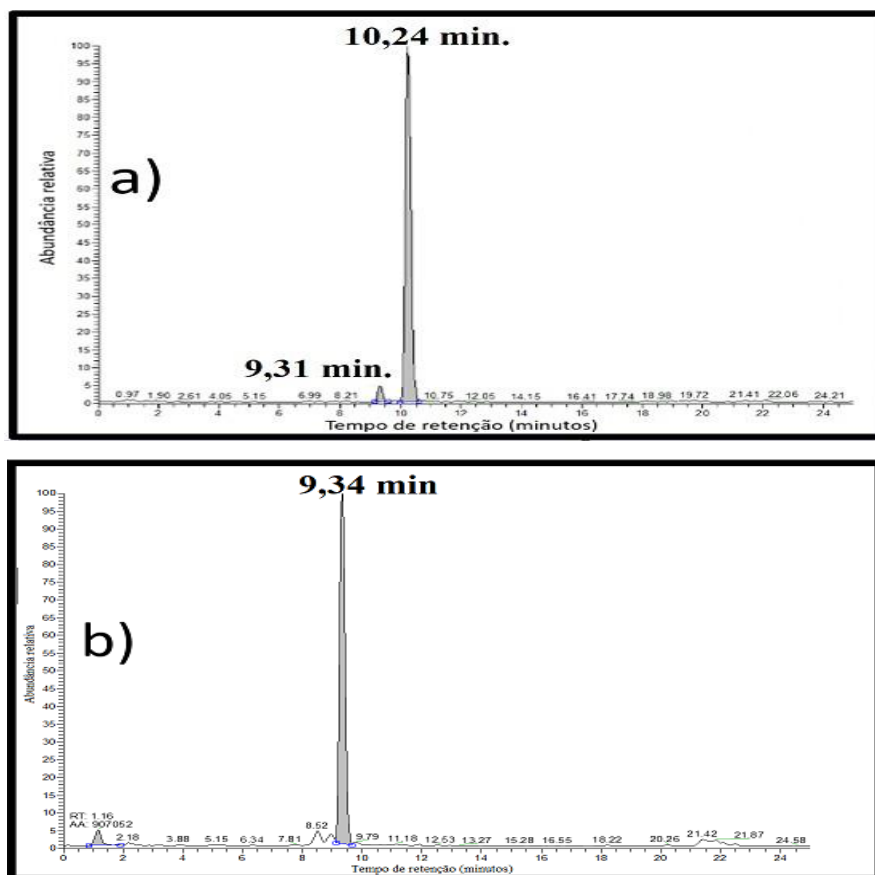


Figura 16 - Tempo de retenção do HPLC em relação a abundância relativa em a) da ICG recentemente preparada e em b) da ICG extraída da NanoICG.

Fonte: Elaborada por Vinicius Guimarães Ferreira

Com a análise de massa por carga das amostras, obteve-se os gráficos da Figura 17. A Figura 17-a mostra uma massa molecular de 753,2 Da para a molécula com tempo de retenção de 10,24 minutos (Figura 16-a). Isso confirma a suposição que o pico do tempo de retenção encontrado na região entre 10,17 e 10,51 minutos pertence a ICG recentemente preparada. Contudo, o peso molecular da ICG é de 774,96 Da. (35) Essa diferença ocorre devido a mudança do cátion de sódio da ICG no HPLC para o cátion de hidrogênio, mostrando uma massa molecular de em torno de 753,4 Da. (43,95) Sendo a massa atômica do Hidrogênio de aproximadamente 1 Da e do Sódio de aproximadamente 22,99 Da, para determinar a massa molar original da ICG deve-se somar a massa do sódio com 753,2 Da, obtido pelo HPLC, e retirar 1 Da do Hidrogênio, chegando a um valor de 775,19 Da da molécula. (97-98)

Já o gráfico da Figura 17-b mostra que, no tempo de retenção entre 9,2 - 9,52 minutos, foi encontrado um peso molecular mais abundante de 752,5 Da. Esse valor representa a dICG carregada com dois prótons de hidrogênio. Assim sendo, como há duas cargas na molécula de dICG, a massa acusada na Figura 17-b está dividida por 2, logo, a massa da dICG com 2 prótons é de H^+ é de 1505 Da. Ao subtrair os cátions de hidrogênio e somar os cátions de sódio, a massa molecular final da dICG se torna 1548,98 Da.

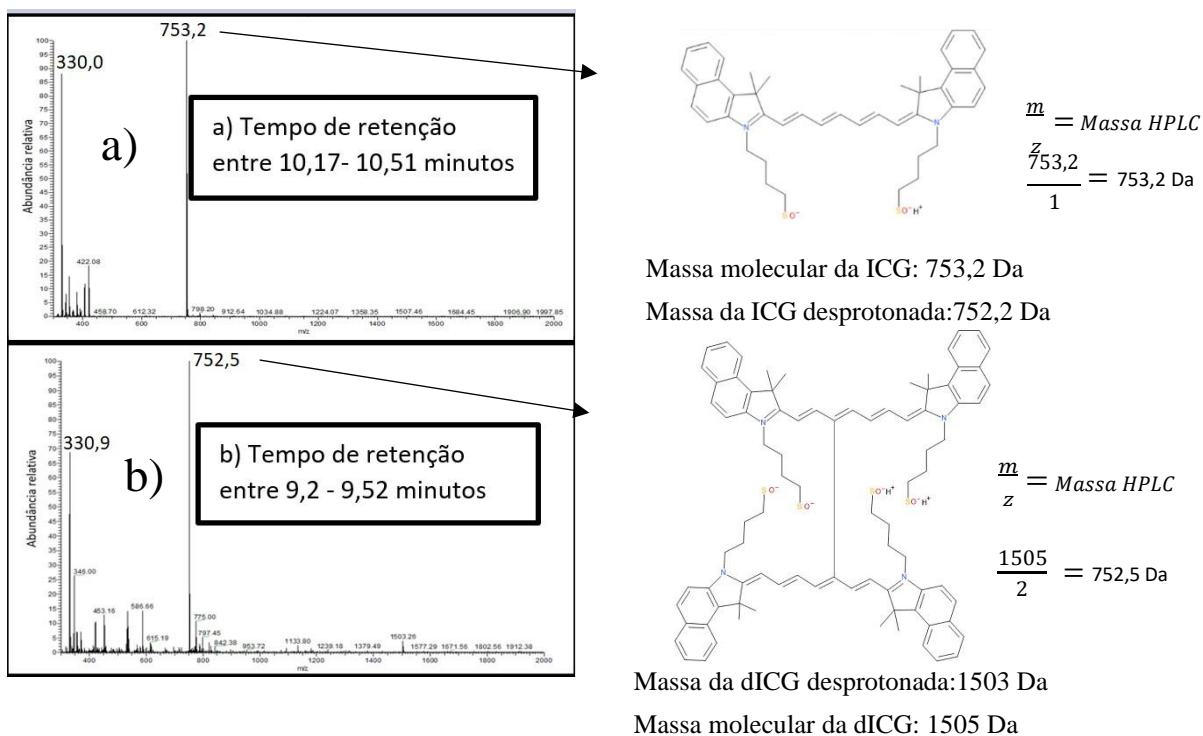


Figura 17 - Tempo de retenção do HPLC em relação a abundância relativa das espécies das moléculas em a) da ICG com a estrutura química da molécula ao seu lado e em b) das moléculas extraídas da NanoICG. Com a estrutura química ao seu lado

Fonte: Elaborada por Vinicius Guimarães Ferreira e pelo autor

Portanto, mesmo após 3 meses da síntese da NanoICG, a dICG presente na nanoemulsão permanece estável a nível molecular. Para compreender a estabilidade do novo composto formado com a síntese e estocagem da nanoemulsão foi comparado o HPLC das amostras após 3 meses (Figura 18-a), e após 1 ano de sua síntese (Figura 18-b).

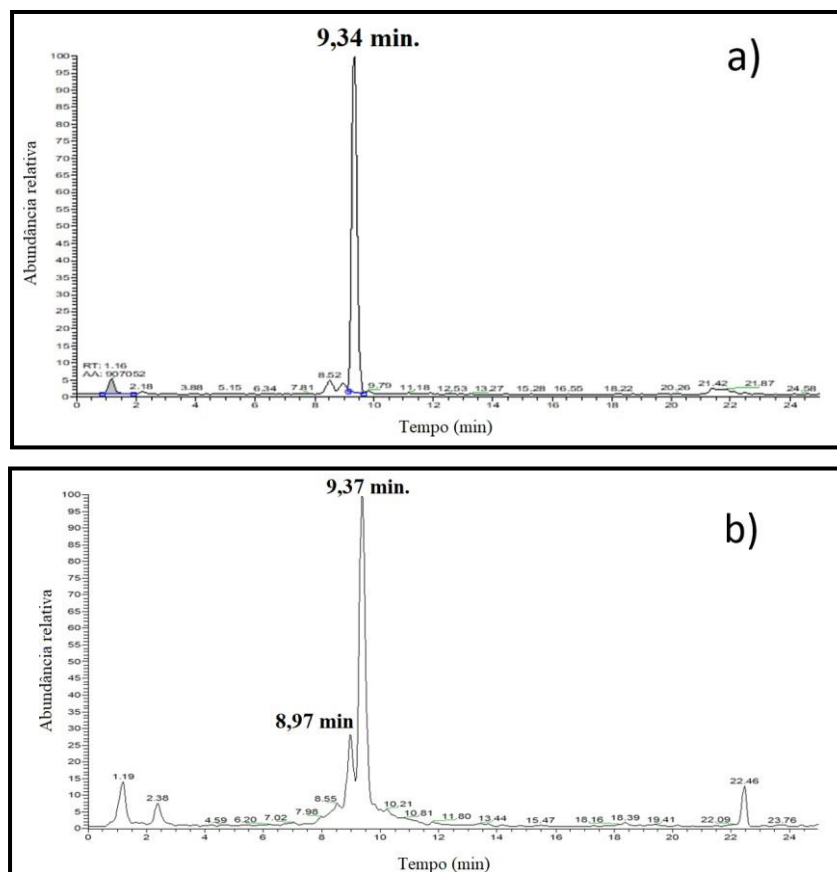


Figura 18 – Tempo de retenção do HPLC em relação a abundância relativa das moléculas extraídas da NanoICG em a) após 3 meses de sua síntese e em b) após 1 ano de sua síntese.

Fonte: Elaborada por Vinicius Guimarães Ferreira

É possível observar que o tempo de retenção referente aos dímeros se mostra com predominância após 3 meses, no valor de 9,34 minutos, enquanto se observa um aumento da formação de outras moléculas com tempos de retenção diferentes da dICG, após 1 ano. Portanto, houve a formação de outros subprodutos da dICG, com variados tempos de retenção, mostrando que, para períodos de tempo na ordem de um ano, a molécula se apresenta instável em solução aquosa. Há uma diferença considerável entre a estabilidade da ICG e a dICG na forma de nanoemulsão em soluções aquosas. A ICG, aproximadamente 70 horas após seu estoque em solução aquosa, apresenta uma degradação de 38% (51) e 6 dias após sua diluição em solução aquosa apresenta uma degradação de aproximadamente 70%. (43)

A Figura 19 esquematiza a NanoICG considerando a dimerização de suas moléculas. Devido ao seu caráter anfifílico, a dICG deve se encontrar na interface da nanoemulsão, enquanto o trioctanoato de glicerol é o composto hidrofóbico que se encontra no interior da mesma.

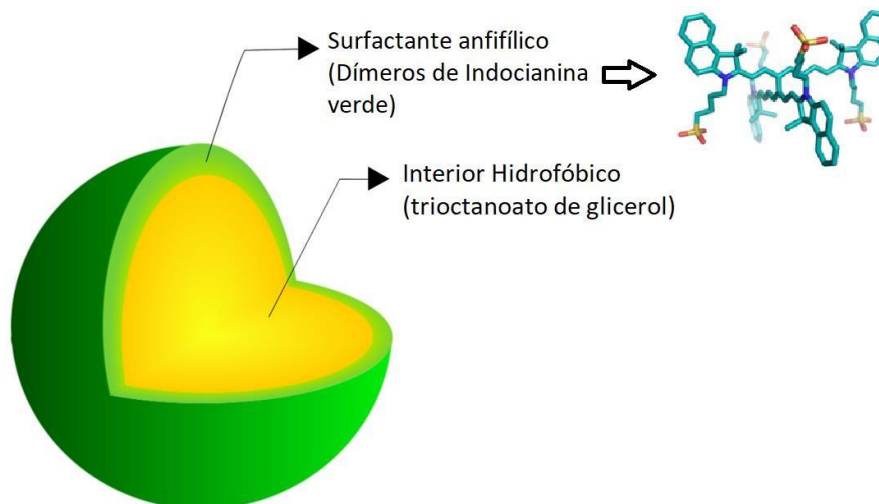


Figura 19 – Nanoemulsão de Indocianina Verde (NanoICG) após a dimerização da ICG.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Apesar da NanoICG ser sintetizada com ICG, suas moléculas passam por um processo de dimerização, formando a dICG, em até 12 dias após sua síntese. No ponto de vista de estabilidade molecular, essa dimerização da ICG pode ser considerada uma vantagem, pois a ICG possui estabilidade reduzida em meios aquosos. Já a dICG apresenta uma estabilidade de pelo menos 3 meses, em solução aquosa, quando na forma de nanoemulsão, como mostram os resultados do HPLC. Contudo, após 1 ano da síntese, há ocorrência de outros subprodutos na nanoestrutura, Figura 18-b.

Com os experimentos com o HPLC também foi possível avaliar outras características da dICG como sua maior massa molecular em relação aos monômeros de ICG, e também, sua maior polaridade (51), acusada pelo tempo de retenção reduzido. Além das análises com a massa e carga das moléculas da nanoemulsão, foram feitos estudos investigando e caracterizando suas propriedades ópticas, como seu espectro de fluorescência em relação ao da ICG recentemente preparada.

4.3 Caracterização do espectro de fluorescência

Sabendo-se que a dICG possui uma capacidade reduzida na produção da fluorescência em comparação com a ICG (51), foram feitos estudos comparativos do espectro de fluorescência em diferentes solventes da NanoICG, da ICG e da dICG extraída da nanoemulsão. Os experimentos realizados com a NanoICG foram feitos sempre em um período entre 12 dias e 3 meses após sua síntese.

Para correlacionar a capacidade de produção de fluorescência da NanoICG e a dimerização da ICG, foram feitos os espectros da NanoICG imediatamente após sua síntese, 2 dias depois e 12 dias depois. A Figura 20 mostra esses espectros de fluorescência da nanoemulsão excitada em $\lambda = 770$ nm e diluída em H₂O ou metanol. É possível perceber que a NanoICG possui emissão de fluorescência maior quando diluída em metanol em relação a H₂O. O mesmo ocorre com a ICG em solventes que a molécula possui mais afinidade, como o metanol, que ajuda a desagregar as moléculas de ICG privilegiando a formação de monômeros, que são os principais responsáveis pela emissão de fluorescência da cianina. (100–102) Além disso, com o tempo após a síntese, há uma perda de sua intensidade de fluorescência. Os períodos analisados no fluorímetro mostrados na Figura 20 são os mesmos analisados pelo HPLC na Figura 13, em que pode se correlacionar dimerização da ICG presente na nanoemulsão com a queda de seu espectro de fluorescência com o passar do tempo.

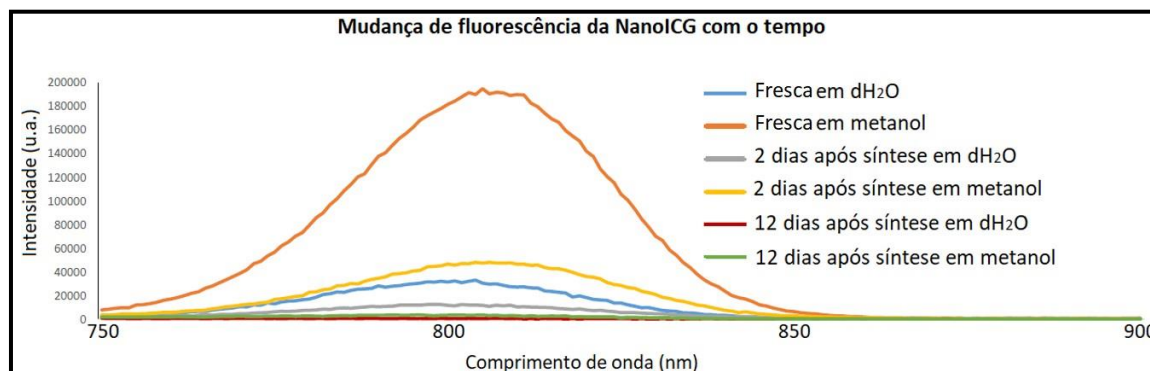


Figura 20 - Redução de fluorescência com o tempo da NanoICG excitada em 770 nm e dissolvida em metanol ou H₂O.

Fonte: Elaborada por Juan Chen (traduzida)

Mindt *et al.* descreveram a correlação da formação do dímero de ICG com a perda de fluorescência da amostra. Quando estocada a 50 µg/mL a 4°C no escuro, a ICG perde, por dia, 6,32% de sua fluorescência, relacionada a uma dimerização da ICG. Fatores como a temperatura, concentração e exposição à luz aceleram esse processo. (43)

Para comparar a intensidade de fluorescência das amostras da ICG, dICG e NanoICG foram feitas análises na concentração de 3,9 µg/mL diluídas em PBS ou metanol. O PBS é um solvente que possui características que privilegiam um estado agregado da cianina enquanto o metanol privilegia um estado monomérico da cianina, mostrando maior solubilidade do composto. (49,101-102)

A Figura 21 mostra a fluorescência da ICG recentemente preparada, da ICG extraída da nanoemulsão (dICG) e da nanoemulsão (NanoICG). É possível observar que a intensidade de

fluorescência produzida pela NanoICG, em PBS, quando excitada em 770 nm foi inferior a 10 u.a., enquanto a ICG mostrou uma fluorescência superior a 380 u.a. Portanto, a intensidade de fluorescência da NanoICG no comprimento de onda de 807 nm é de aproximadamente 1,5% em relação à ICG em 807 nm.

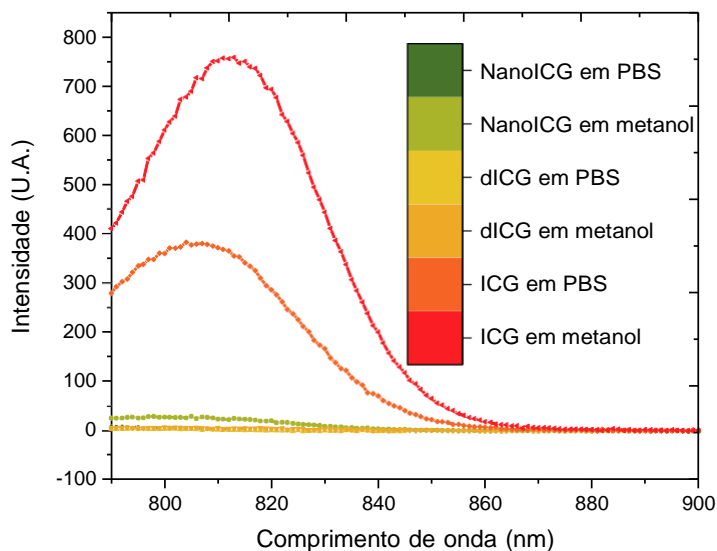


Figura 21 - Fluorescência da NanoICG 2,5 μ M, dICG 2,5 μ M e ICG 5 μ M em PBS e metanol quando excitadas em 770nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tanto a NanoICG quanto a ICG mostraram maior produção de fluorescência quando diluídas em metanol em relação ao PBS. Como a NanoICG é formada por dICG, isso mostra similaridades entre as formas monoméricas e diméricas da ICG quanto à produção de fluorescência e ao solvente utilizado. (50,100) Em metanol, a NanoICG apresentou uma fluorescência de aproximadamente 30 u.a., e a ICG de aproximadamente 760 u.a. A relação da emissão de fluorescência em 808 nm da NanoICG em relação a ICG foi de aproximadamente 3,5%. Os dímeros de ICG mostraram em PBS uma fluorescência em torno de 4 u.a. e em metanol em torno de 7 u.a.

Mindt *et al.*, em 2018, correlacionou a formação do dímero com a perda de fluorescência da amostra. Quanto maior a presença do dímero, menor o sinal de fluorescência, sendo que o valor da fluorescência do dímero de ICG é aproximadamente 100 vezes menor do que do monômero. (43,51) Além disso, tanto a ICG quanto a dICG em solventes que promovem a desagregação da solução, mostram maior emissão de fluorescência. (51,100,102)

Os resultados da dimerização da ICG mostrado pelo HPLC na Figura 13 estão de acordo com a perda de fluorescência mostrada pela NanoICG em relação à ICG. Portanto, é possível relacionar o espectro de fluorescência com o processo de dimerização. Além disso, tanto a ICG quanto a NanoICG se mostraram mais eficientes na produção em sua forma com menor agregação, ou seja, com maior proporção de monômeros da molécula. Apesar da diminuição da fluorescência da nanoemulsão de ICG após sua dimerização, foi importante caracterizar outros aspectos da molécula ao interagir com a luz, como seu espectro de absorção óptico.

4.4 Caracterização do espectro óptico em meios aquosos com alterações de solventes e temperaturas

Como mostrado pelo HPLC, houve a dimerização da ICG, mudando características ópticas da molécula. Para caracterizar a propriedade de absorção de luz da NanoICG, foi aferido o espectro de absorção da nanoemulsão em diferentes solventes, após a dimerização. Os testes de absorção de luz foram feitos no espectro entre 300 e 1000 nm e comparados com os espectros da ICG. Os experimentos foram feitos em três diferentes solventes para a comparação: PBS, H₂O e metanol, sendo as amostras diluídas na mesma concentração de 3,9 µg/mL. Como identificado, a NanoICG possui a ICG em sua interface na forma dimérica e cada dICG tem aproximadamente duas vezes a massa da ICG. Assim sendo, a ICG e a NanoICG diluídas em uma mesma concentração, 3,9 µg/mL, possuem uma molaridade diferente, de 5 µM e 2,5 µM, respectivamente.

As características conhecidas da ICG nos solventes utilizados são que a cianina possui maior afinidade pelo metanol do que pela H₂O, mostrando um espectro com predomínio da banda de monômeros da solução. (101,104) Já o PBS, é um meio menos solúvel que a H₂O para a ICG, sendo que os sais presentes na solução promovem o empacotamento da molécula e também ajudam na estabilização dos agregados-J, acusando bandas em seu espectro de absorção de luz relacionadas a agregados. (103,105) Levando isso em conta, é possível comparar as similaridades e diferenças no comportamento dos espectros da nanoemulsão e da ICG livre nos diferentes solventes.

Os formatos dos espectros de absorção óptica de ambas as amostras em metanol foram similares, como mostrado na Figura 22-a. A ICG atingiu um máximo de absorção de luz em 782 nm, com intensidade de absorção de aproximadamente 0,973 (u. a.) enquanto a NanoICG apresentou um máximo de absorção de luz em 778 nm e intensidade de 0,452 (u. a.). Portanto, houve um deslocamento de 4 nm para a esquerda no máximo de absorção de luz da banda dos

dímeros livres da NanoICG e uma redução de 46% na intensidade de absorbância em relação à ICG. Essa diminuição nas bandas de absorção com um leve deslocamento em direção ao azul acontece, justamente, quando há a formação de dímeros de ICG (52), o que reforça que constituição dimérica das moléculas presentes na interface da nanoemulsão.

Apesar de existirem similaridades na forma do espectro de absorção óptica da NanoICG e da ICG em metanol, em H₂O houve um deslocamento para o vermelho da banda de absorção de luz das moléculas da nanoemulsão, como mostrado na Figura 22-b. A nova banda formada pelos agregados das moléculas da nanoemulsão mostrou um máximo de absorção de luz em 894 nm, com uma absorbância de 0,8809 (u.a.) enquanto o ponto máximo de absorção de luz da ICG foi em 780 nm, com uma absorbância de 0,72249 (u.a.). Os valores referentes ao máximo de absorção de luz de cada composto, nos respectivos solventes, estão resumidos na Tabela 4. Esse deslocamento da banda para o vermelho, também chamado de *Red-shift* (termo em inglês), está relacionado à formação de agregados-J. (46) Assim, podemos concluir que, além da constituição das nanoemulsões serem de dímeros, eles se agrupam na forma de agregados-J quando em H₂O, e podem ser desagregados em solventes como o metanol.

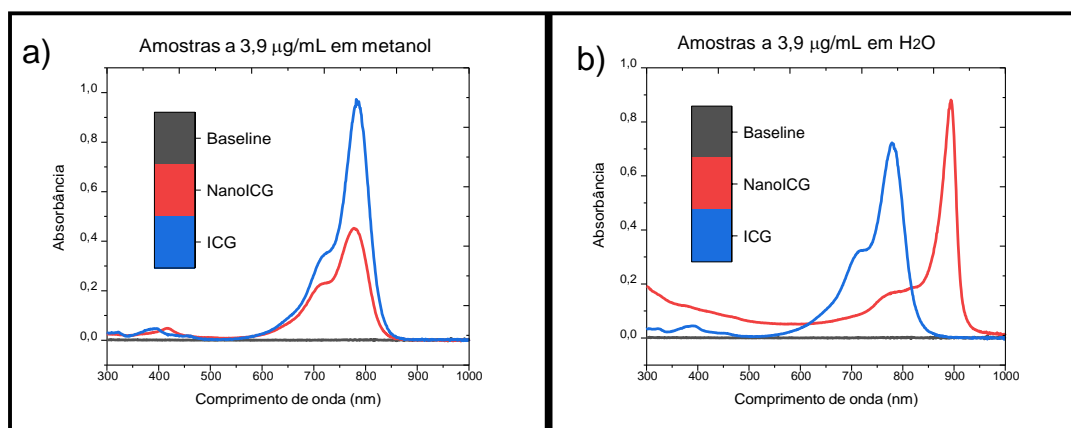


Figura 22 -- Espectro de absorção óptica da ICG e da NanoICG em a) em metanol e em b) em H₂O.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4 - Espectro de absorção óptica da ICG e da NanoICG em metanol em e H₂O

Massa molar	Abs em Metanol (u.a.)	Abs em H ₂ O (u.a.)
<i>ICG (3,9 µg/mL)</i>	0,97253 (782 nm)	0,72249 (779 nm)
<i>dICG (3,9 µg/mL)</i>	0,45229 (778 nm)	0,8809 (894 nm)

Fonte: Elaborada pelo autor

Os agregados-J, descritos por Jelley, na década de 1930, possuem a característica do *red-shift* no espectro de absorção óptica, com ligações π - π não covalentes, interações hidrofóbicas e ligações de modo cabeça à cauda. (45,105-106) Um esquema dessas ligações está mostrado na Figura 23-a. Esses agregados se destacam pela sua eficiência como agente fototérmico e possuem a característica de realizar um *quenching* em sua fluorescência. Em cianinas como a ICG, os agregados-J se formam com maior facilidade quando aquecidos. Ao esquentar uma solução de ICG na concentração de 1,5 mM na temperatura de 65°C, por 25 horas, ocorre a transição completa das moléculas em solução para o estado de agregados-J. (107)

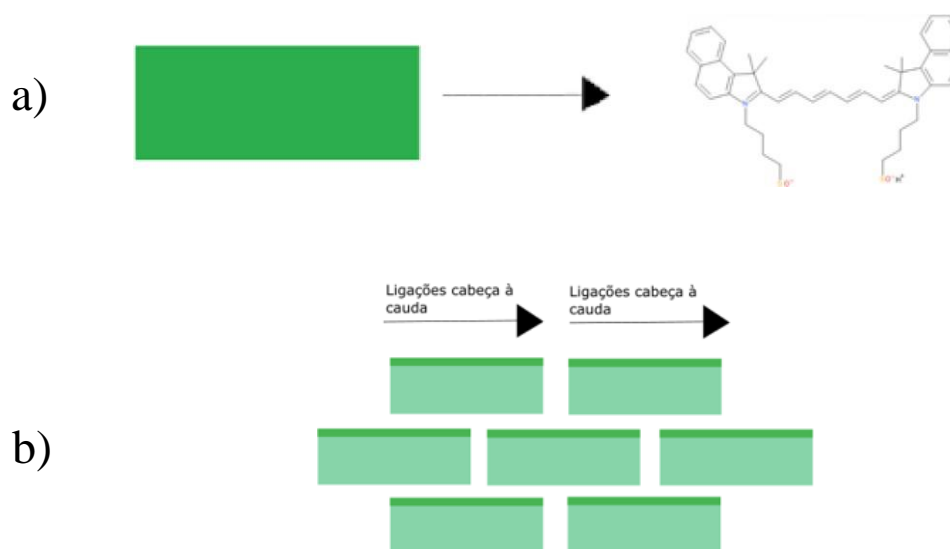


Figura 23 - Em a) esquema da molécula da ICG) e em b) modo de formação dos agregados-J com a ICG.

Fonte: Elaborada pelo autor

Comparando os espectros de absorção óptica da ICG ou da NanoICG, ambas diluídas em diferentes solventes, como mostra a Figura 24, é possível observar variações entre eles. As Figuras 22-a e 22-b mostram o comportamento da NanoICG e da ICG, respectivamente, diluídas em 3 diferentes solventes. Observa-se que a NanoICG forma agregados-J em solventes como PBS e H₂O, com um máximo em 894 nm. Contudo, em solventes orgânicos como o metanol, ocorre a transição das bandas de absorção de luz para as regiões de 780 nm e 715 nm (Figura 24-a). Já a ICG, nos solventes e concentração utilizados, apresentou 2 bandas de absorção de luz principais; uma com um máximo na região 780 nm, devido aos seus monômeros, e outra com um máximo em 715 nm, devido a formação de agregados-H, que são ligações de duas moléculas de ICG face a face. (46,108)

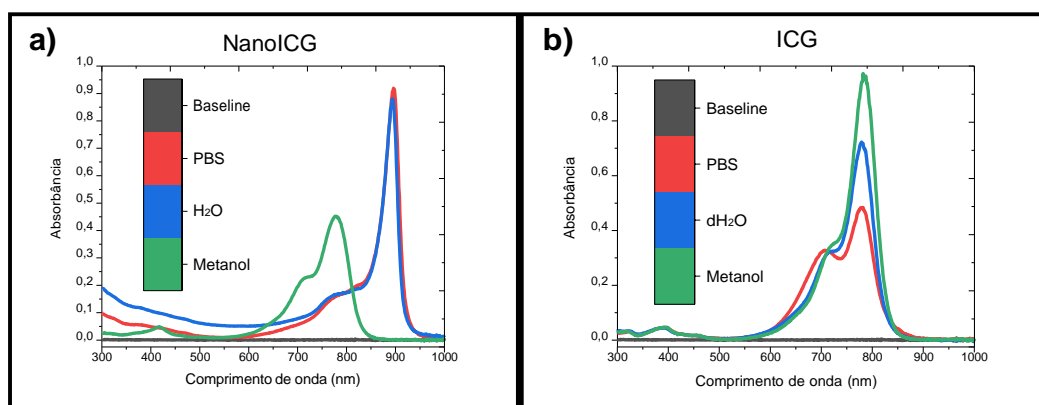


Figura 24 - Espectro de absorbância em diferentes solventes na concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ de a) NanoICG e b) ICG.

Fonte: Elaborada pelo autor

Diferentes solventes irão solubilizar a ICG de acordo com suas propriedades. A solubilidade da ICG em PBS é de 0,5 mg/mL, em H₂O e etanol de 1 mg/mL e em DMSO de 10 mg/mL(104,109). Quando a ICG está diluída em H₂O, um solvente mais polar que o metanol, ocorre a diminuição de intensidade de absorção de luz da banda dos monômeros, Figura 24-b. Há uma diminuição ainda mais significativa da intensidade máxima de absorção de luz dessa banda quando a cianina é diluída em PBS, e um favorecimento da formação da banda de absorção de luz correspondente ao seu estado de agregados-H (109-110), mostrado na Figura 24-b.

A maior expressão da banda das moléculas livres, com um máximo em aproximadamente 780 nm, tanto da ICG quanto da NanoICG, quando em metanol (Figura 24) pode ser correlacionado com a Figura 21. Essa correlação indica maior fluorescência das amostras quando em metanol, solvente que promove a maior desagregação em monômeros das

amostras. É evidente na literatura a importância dos monômeros de ICG na sua capacidade de fluorescência. (100) Isso indica que assim como para a ICG, a dICG em sua forma monomérica também é mais eficiente na produção de fluorescência. Outro resultado mostrado da NanoICG, é sua capacidade de se manter em estados de agregados-J em solventes como PBS e H₂O, fato também observado na literatura para a ICG. (46,108)

A característica da NanoICG de possuir diferentes espectros de absorção dependendo do solvente foi sintetizada em uma comparação com a ICG na Figura 25, sendo indicado por flechas o responsável por cada espectro de absorção. Quando a NanoICG está diluída em H₂O ou PBS, há a estabilização de agregados-J, com um máximo de absorção de luz em $\lambda = 894$ nm. Contudo, em solventes como o metanol há sua desagregação, o que demonstra que o solvente influencia diretamente no estado de agregação das moléculas da nanoemulsão. Além disso, entende-se que os dímeros de ICG da NanoICG possuem menor absorção de luz que a ICG nas bandas suas bandas com maior pronunciadas, considerando a mesma densidade (3,9 $\mu\text{g/mL}$). (52)

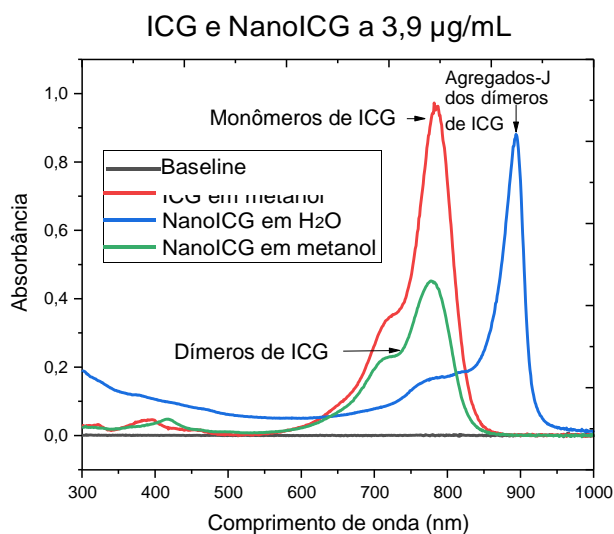


Figura 25- ICG em metanol e NanoICG em metanol ou H₂O.

Fonte: Elaborada pelo autor

Assim sendo, os dímeros que compõe a NanoICG possuem um *red-shift* no espectro de absorção óptica em relação à ICG devido aos agregados-J formados, mas podem se desagregar para sua forma monomérica dependendo do solvente utilizado. Para compreender a influência dos sais na estabilização dos agregados-J da NanoICG, foram feitos testes com misturas de solventes, observando a variação do espectro de absorção óptica das amostras com o tempo.

4.4.1 Estabilidade da NanoICG com mistura de solventes

No intuito de compreender a estabilidade dos agregados-J presentes nas nanoemulsões de ICG, foram feitos testes com diferentes porcentagens de metanol e sais em sua composição. O comportamento observado na Figura 24-a de desagregação dos agregados-J da NanoICG, quando diluída em metanol, se repetiu para soluções contendo 50% metanol e 50% H₂O ou 50% metanol e 50% PBS, como mostrado na Figura 26.

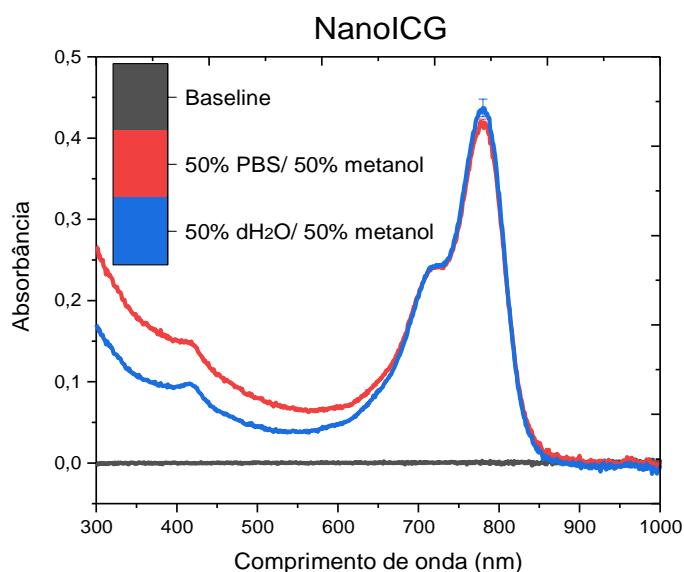


Figura 26 - NanoICG a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluída em uma mistura de 50% metanol e 50% PBS ou 50% metanol e 50% H₂O.

Fonte: Elaborada pelo autor

A presença de 50% de metanol na solução mostrou-se suficiente para a desagregação imediata das moléculas da NanoICG, quando misturada com H₂O ou misturada com uma solução salina, o PBS. Contudo, os agregados-J da NanoICG mostraram resistência à desagregação quando a amostra foi diluída em uma solução com 75% de PBS e 25% de metanol (Figura 27-a). Houve também maior dificuldade de desagregação dos agregados-J em uma solução sem sais, com 75% de H₂O e 25% de metanol (Figura 27-b), mostrando a influência do solvente e dos sais do PBS na estabilização dos agregados-J da NanoICG.

Os gráficos das Figuras 25-c e 25-d mostram a variação da amplitude das bandas de absorção de luz da NanoICG no período de 15 minutos após sua diluição. A Figura 27-c mostra um aumento de aproximadamente 102% na absorção de luz da NanoICG em $\lambda = 780 \text{ nm}$ da NanoICG com sua diluição em uma mistura de H₂O e metanol e um aumento de apenas 28%

quando a mistura é de metanol com PBS. Isso mostra menor formação da banda de absorção de luz da dICG livre na última mistura apresentada. Por sua vez, há menor variação na amplitude banda dos agregados J NanoICG na solução com PBS em relação a solução com H₂O, como mostra a Figura 27-d. A amplitude do máximo de absorção de luz dos agregados-J diminui em torno de 11% na solução com PBS e aproximadamente 73% na solução com H₂O.

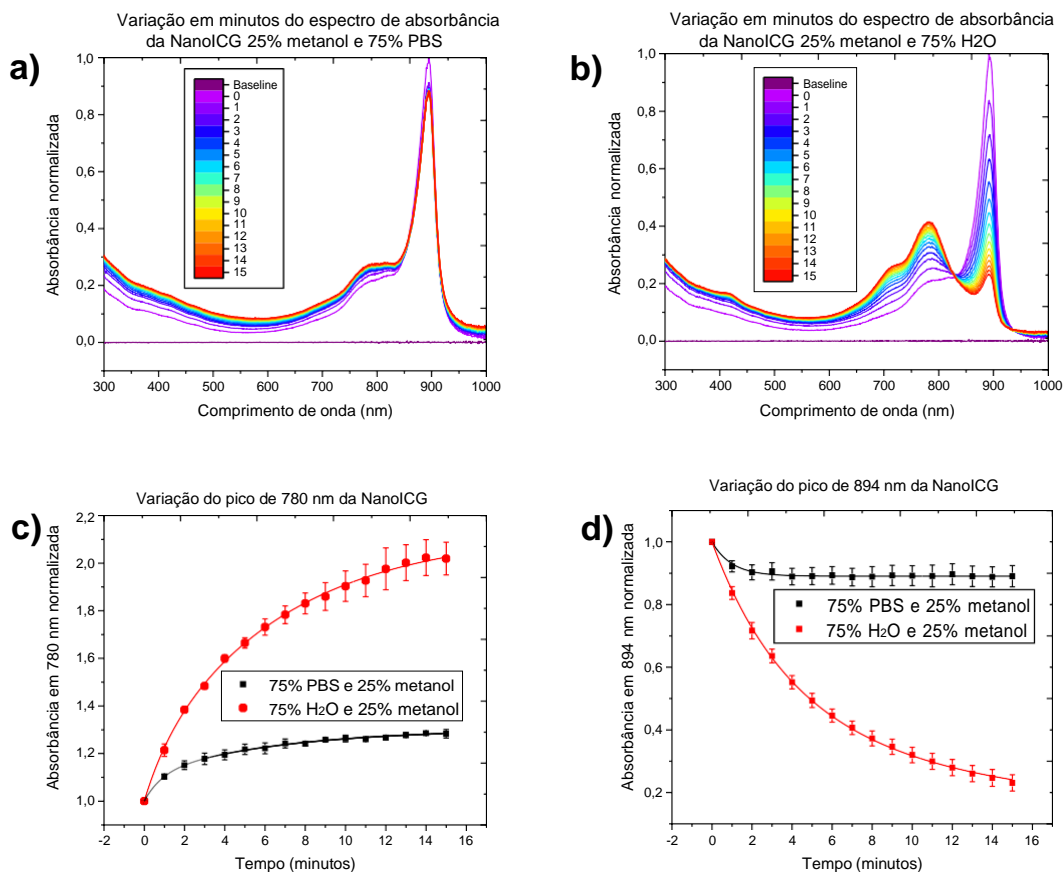


Figura 27 - Em a) NanoICG (3,9 µg/mL) diluída em uma mistura de metanol e PBS, em b) NanoICG (3,9 µg/mL) diluída em uma mistura de metanol e H₂O. Em c) variação de absorção de luz da NanoICG em $\lambda = 780$ nm e em d) em $\lambda = 894$ nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Assim como para a ICG, (102) o metanol mostrou também a capacidade de privilegiar a forma desagregada da molécula no caso da dICG. Além disso, quando há a mistura do metanol com solventes mais polares, como a água, há menor desagregação da molécula e maior estabilidade dos agregados-J. Contudo, a estabilidade é ainda mais evidente quando a mistura ocorre em PBS, solvente em que a ICG é pouco solúvel. (104,111-112) Isso mostra que, dependendo da capacidade de solubilização e da presença de sais no meio em que a NanoICG se encontra, haverá ou não a dissociação dos agregados-J, o que é fundamental para

compreender em quais solventes a NanoICG pode ser diluída, preservando seu estado de agregação e a estabilidade de suas moléculas.

Há, portanto, a influência dos sais do PBS na estabilidade dos agregados-J na NanoICG. Para a caracterização do espectro de absorção óptico dos dímeros da ICG em sua forma livre, foi feita a análise da dICG extraída da NanoICG. Além disso, para investigar variações no estado de agregação da NanoICG e da dICG com a mudança na concentração da amostra, foi feita a análise da Lei de Beer Lambert da nanoemulsão em PBS e H₂O.

4.4.2 Extração dos dímeros de ICG para análise de seu espectro de absorção óptico

Foram extraídos os dímeros da NanoICG, segundo a seção 3.2 da metodologia, para a realização de análises em seu espectro de absorção óptico. Os dímeros extraídos foram estocados em H₂O na concentração estimada de 1,7 mg/mL.

A Figura 28 mostra o espectro de absorção da dICG diluída em metanol e a formação dos agregados-J da solução estocada em H₂O com o tempo. Existe uma tendência de formação dos agregados-J em cianinas devido à polarizabilidade das polimetinas da molécula que, normalmente, se formam espontaneamente em soluções aquosas quando em altas concentrações, como a de 1 mg/mL. (48,113) Apesar da variação com o tempo da banda dos agregados-J presentes na solução, houve uma estabilidade na banda representada pela dICG livre, diluída em metanol (Figura 28). Isso mostra que há uma consistência no número de moléculas de dICG na solução com o passar dos meses e uma variação na proporção de agregados-J formados.

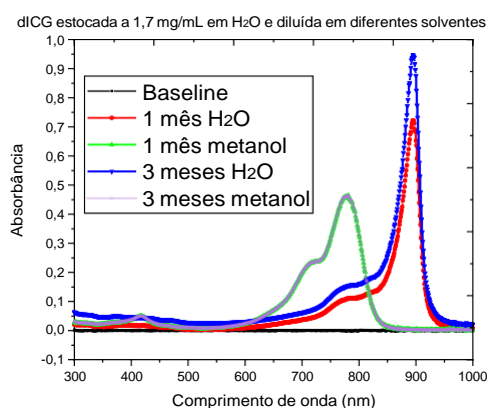


Figura 28 - Formação de agregados-J da dICG após 1 mês ou 3 meses de diluição.

Fonte: Elaborada pelo autor

Após a extração da dICG e do seu estoque em solução aquosa por 3 meses com a formação de agregados-J, foram feitos comparativos entre a aplicabilidade da Lei de Beer Lambert na NanoICG e na dICG.

4.5 Lei de Beer Lambert

Para compreender a faixa de valores onde há correlação linear entre a concentração das amostras de NanoICG e dICG em metanol e H₂O e sua absorbância, foi feita a razão de Beer Lambert com a Equação 1. Com isso, foi possível determinar o coeficiente de extinção molar das amostras a partir das análises de diferentes comprimentos de onda e em diferentes solventes.

4.5.1 NanoICG em H₂O

Para medir a linearidade do aumento da absorbância da amostra da nanoemulsão relacionado com o aumento de sua concentração, foi feita uma curva de calibração da NanoICG diluída em H₂O, em concentrações variando de 0,05 a 5 μ M. Em todas as concentrações houve uma maior presença de absorção de luz na região entre 750 nm e 900 nm, apresentando um máximo em 894 nm, como mostrado na Figura 29. Além disso, entre 715 nm e 820 nm formou-se um ombro no espectro de absorção óptico, mesma região em que há maior intensidade do espectro óptico da dICG desagregada. (52) A partir das informações apresentadas na Figura 29 sobre o perfil do espectro de absorção óptico, foram utilizados os comprimentos de onda de 894 nm para comparar a linearidade de absorção de luz da amostra com seu aumento de concentração. Também foram analisados os comprimentos de onda em 780 nm que se correlaciona com a banda de absorção de luz da ICG monomérica. (114) O comprimento de onda de 810 nm, que forma uma parte do ombro do espectro de absorção de luz, foi também analisado quanto a sua linearidade. Além disso, é importante entender o comportamento do espectro de absorção óptico da NanoICG em relação a sua concentração no comprimento de onda $\lambda = 810$ nm pois, nesse trabalho, foi utilizado um laser com esse λ para a realização de análises de fotodegradação e experimentos com PTT em *phantoms* e *in vivo* da NanoICG.

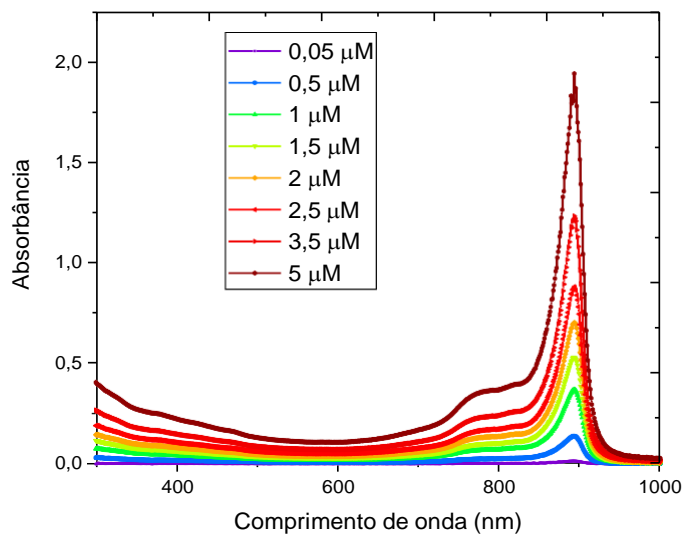


Figura 29 - NanoICG diluída em H_2O em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 30 mostra retas que definem os coeficientes de extinção molar da NanoICG, relacionando a absorbância e as respectivas concentrações nos 3 comprimentos de onda. Como os valores possuem uma relação linear para a região de concentração estudada, é possível usar a Lei de Beer Lambert nessa faixa de concentração. As retas foram traçadas com os pontos obtidos na faixa de concentração utilizada da NanoICG nos comprimentos de onda de $\lambda = 780$ nm, $\lambda = 810$ nm e $\lambda = 894$ nm e os coeficientes de extinção molar foram extraídos.

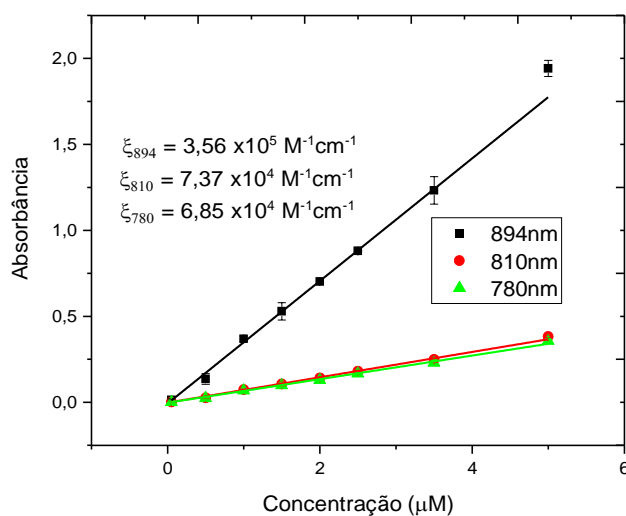


Figura 30 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da NanoICG diluída em H_2O .

Fonte: Elaborada pelo autor

O coeficiente de extinção molar da NanoICG entre 0,05 μM e 5 μM em $\lambda = 894 \text{ nm}$ foi de $\epsilon_{894} = 3,56 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Já para $\lambda = 810 \text{ nm}$ foi de $\epsilon_{810} = 7,37 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e, para $\lambda = 780 \text{ nm}$, o coeficiente foi de $\epsilon_{780} = 6,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Os coeficientes de extinção molar da NanoICG em 780 nm e 810 nm são similares, mostrando que há uma capacidade de absorção da luz com intensidade próxima nesses pontos. Já o coeficiente de extinção molar em 894 nm da NanoICG é em torno de 5 vezes maior que dos coeficientes em 780 nm e 810 nm, acusando um máximo de absorção de luz local. Para caracterizar a influência da concentração da NanoICG na sua desagregação, foram feitos testes em metanol.

4.5.2 NanoICG em metanol

A curva de calibração da NanoICG também foi feita em metanol para aferir a absorção óptica dos dímeros de ICG desagregados, variados nas mesmas concentrações feitas em H_2O , entre 0,05 μM e 5 μM . A Figura 31 mostra duas bandas de absorção óptica predominantes, com máximos em aproximadamente, 780 nm e 715 nm. A ICG e a dICG, quando diluídas em metanol, possuem bandas com absorção de luz em regiões similares como mostra a Figura 22 a) e corrobora com a literatura. (52) Ademais, entre 400 nm e 450 nm, há outra banda de absorção de luz, que possui similaridades com a banda apresentada pela ICG nessa região, representando a transição eletrônica do singlete em seu estado fundamental para o seu segundo estado excitado ($S_0 \rightarrow S_2$) (115)

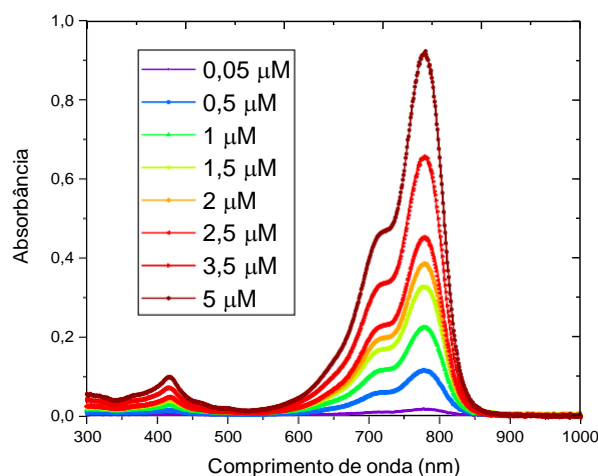


Figura 31- NanoICG diluída em metanol em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os comprimentos de onda utilizados para realizar as curvas de calibração foram de 780 nm e 715 nm. A Figura 32 expressa as duas retas, que definem o coeficiente de extinção molar para os comprimentos de onda analisados. O coeficiente de extinção molar extraído utilizando o comprimento de onda de 780 nm foi o mais intenso de $\epsilon_{780} = 1,84 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. O coeficiente ϵ_{780} foi similar ao encontrado na literatura quando utilizado o comprimento de onda máximo da molécula de 796 nm da dICG diluída em soro fetal bovino (FBS) com o valor de $2,56 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. (51) Sendo que o FBS possui a característica de deslocar a banda de cianinas, como a ICG, para direita. (45) Já para o comprimento de onda de 715 nm, o coeficiente extraído foi de $\epsilon_{715} = 9,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, mostrando que essa região possui menor intensidade de absorção de luz em relação a região de 780 nm devido ao menor coeficiente de extinção molar.

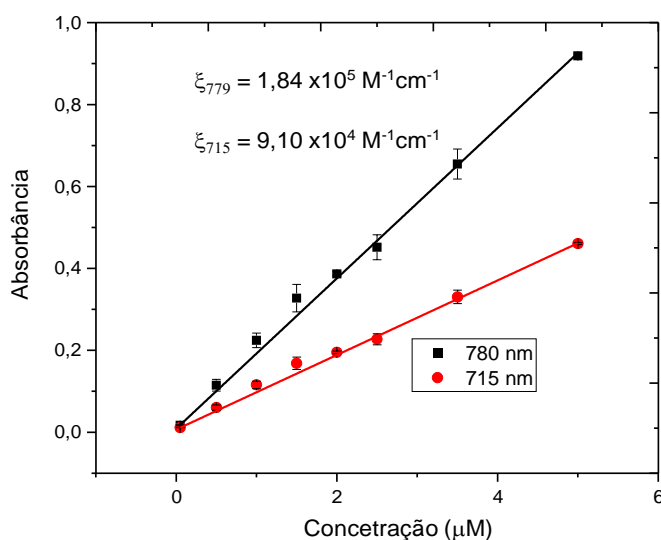


Figura 32 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da NanoICG diluída em metanol.

Fonte: Elaborada pelo autor

Na faixa observada, entre $0,05 \mu\text{M}$ a $5 \mu\text{M}$ da NanoICG, tanto em H_2O quanto em metanol, existe a correlação linear do aumento da concentração e aumento da absorbância da amostra, mostrando que o espectro de absorção óptico se mantém similar e proporcional com as alterações de concentração. Essa linearidade indica não haver variações em fenômenos de agregação das soluções (103,116), mostrando que o metanol é capaz de desagregar a NanoICG, nessa faixa de concentração. Além disso, a NanoICG em metanol, entre as concentrações de $0,05 \mu\text{M}$ e $5 \mu\text{M}$, possui valores próximos quanto às bandas de absorção de luz e o coeficiente de extinção molar da dICG descrita na literatura (51), o que mostra que a dICG preserva suas

características ópticas no formato de nanoemulsão. Para encontrar variações e semelhanças entre os dímeros utilizados na forma de nanoemulsão e os dímeros livres foram feitos testes com a dICG extraída da NanoICG.

4.5.3 dICG em H₂O

Para realizar a curva de calibração da dICG em H₂O, foi utilizada a amostra com 3 meses de estocagem. Para estimar a concentração dos dímeros extraídos da nanoemulsão, foi feita a diluição da amostra em metanol e aplicados os coeficientes de extinção molar nos valores de $\epsilon_{715} = 9,10 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{780} = 1,84 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ no cálculo da molaridade da solução. Os agregados-J foram vistos no espectro de absorção óptico em toda a variação de concentração da molécula utilizada, de 0,05 μM a 5 μM , como mostra a Figura 33.

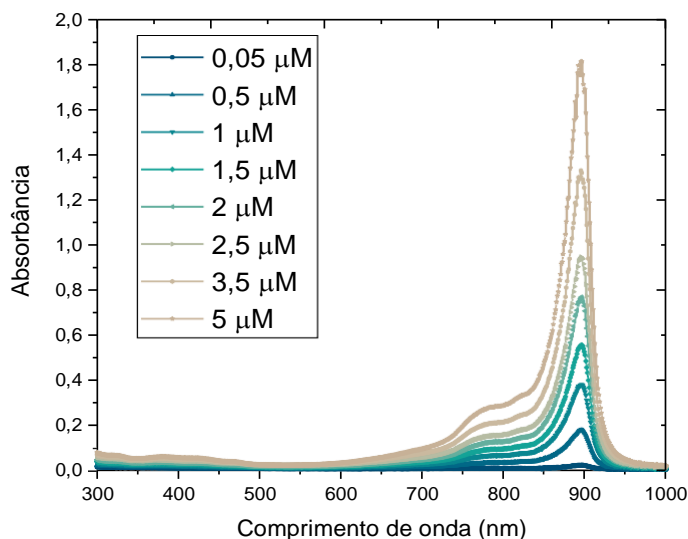


Figura 33 - dICG diluída em metanol em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 34 mostra as diferentes retas que definiram os coeficientes de absorção óptica da dICG, sendo o coeficiente de extinção molar extraído da reta referente ao comprimento de onda de 894 nm de $\epsilon_{894} = 3,64 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, similar à NanoICG de $\epsilon_{894} = 3,56 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Figura 29). Já para o comprimento de onda de 810 nm o coeficiente de extinção molar foi de $\epsilon_{810} = 6,22 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$, um pouco menor do que o coeficiente mostrado pela NanoICG no mesmo comprimento de onda de $\epsilon_{810} = 7,37 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Para o valor de 780 nm, o coeficiente

de extinção molar da dICG foi de $\epsilon_{780} = 5,68 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e da NanoICG, foi também maior, no valor de $\epsilon_{780} = 6,85 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

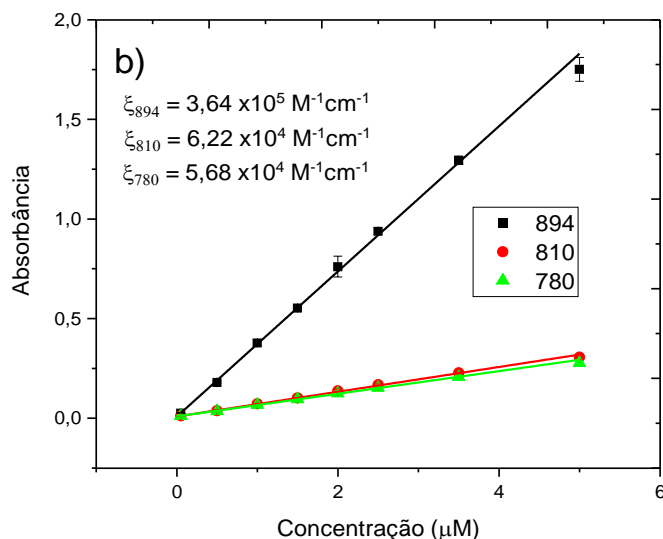


Figura 34 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da dICG diluída em metanol.

Fonte: Elaborada pelo autor

Portanto, tanto a NanoICG quanto a dICG mostraram características semelhantes na faixa de concentração do espectro de absorção óptico analisados, sendo que ambas respeitaram a lei de Beer-Lambert em H_2O . A dICG apresentou a característica de formar agregados-J em soluções aquosas, assim como ocorreu com a NanoICG. A maior diferença dos coeficientes de extinção molar encontrados nas amostras diluídas em H_2O foram na faixa de 780 nm e 810 nm em que a NanoICG apresentou coeficientes aproximadamente 20% maiores que da dICG, mostrando uma maior capacidade de absorção de luz nessas regiões da nanoemulsão em relação à dICG. Além disso, ambas as amostras mostraram um coeficiente de extinção molar semelhantes para 894 nm, com variação de aproximadamente 2%.

4.5.4 dICG em metanol

Foram feitas as análises do comportamento do espectro de absorção óptico da dICG quando diluída em metanol na faixa entre 0,05 μM a 5 μM . Com isso, foi possível extrair o coeficiente de extinção molar a partir dos valores de absorção de luz em $\lambda = 715 \text{ nm}$ e $\lambda = 780 \text{ nm}$ da dICG. A Figura 35 mostra os espectros de absorção óptica da dICG em diferentes

concentrações. Os espectros mostrados, possuem duas bandas de absorção prevalentes com máximos nas regiões de $\lambda = 715 \text{ nm}$ e $\lambda = 780 \text{ nm}$ e outra pequena banda com máximo em torno de 400 nm , mostrando similaridades com os máximos encontrados nos mesmos locais da NanoICG diluída em metanol (Figura 30), reafirmando que os dímeros extraídos da NanoICG mostram as mesmas propriedades do espectro de absorção óptico dos dímeros desagregados pelo metanol da NanoICG.

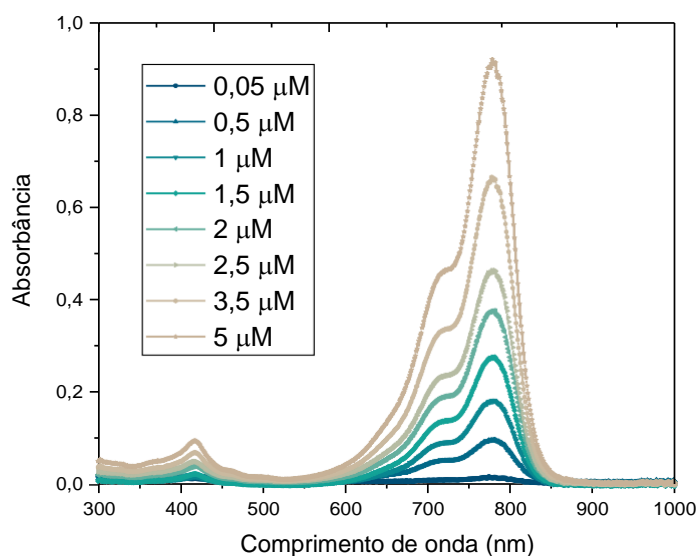


Figura 35 - dICG diluída em metanol em diferentes concentrações.

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 36 mostra as curvas de calibração de ambos os comprimentos de onda. Os valores obtidos dos coeficientes de extinção foram de $\epsilon_{780} = 1,85 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ e $\epsilon_{715} = 9,07 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Os coeficientes de extinção molar mostraram variação menor que 1% comparados aos obtidos a partir da NanoICG em metanol ($\epsilon_{780} = 1,84 \times 10^4$ e $\epsilon_{715} = 9,10 \times 10^4$). Com isso, verifica-se que os dímeros da NanoICG extraídos mantiveram suas características quanto ao espectro de absorção óptico.

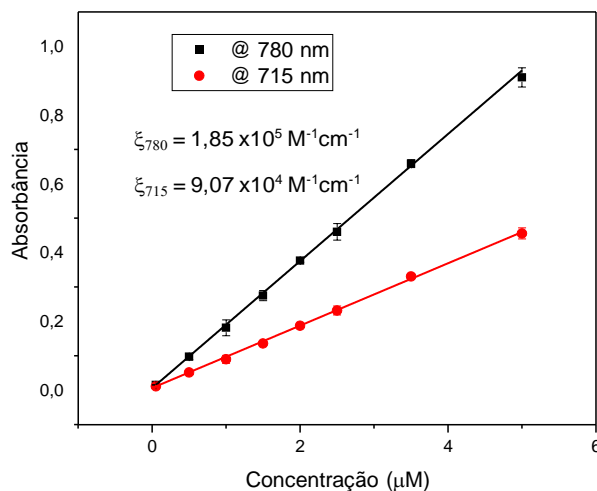


Figura 36 - Curva de calibração de diferentes pontos de absorbância da dICG diluída em metanol.

Fonte: Elaborada pelo autor

Portanto, a dICG, assim como a NanoICG, mostram a capacidade de formação de agregados-J com o tempo após sua diluição em solução aquosa. Além disso, os coeficientes de extinção molar das amostras diferem de menos de 2%, com exceção dos coeficientes ϵ_{780} e ϵ_{810} das amostras diluídas em H₂O. Nesse caso, a variação dos coeficientes entre a NanoICG e a dICG é de aproximadamente 20%. Os fatores que diferem a NanoICG da dICG podem estar relacionados com a presença do óleo na nanoemulsão e o arranjo espacial dos agregados-J das amostras. (117) Ademais, todas as amostras mantiveram sua linearidade entre concentração e absorção de luz nos comprimentos de onda analisados, podendo se estimar a concentração de moléculas na solução de acordo com a absorção de luz apresentada. Além de testes focados na avaliação dos coeficientes de extinção molar da NanoICG e da dICG, foram feitos testes relacionados à estabilidade dos espectros de absorção ópticos da dICG, NanoICG e ICG.

4.6 Termoestabilidade em diferentes solventes

No intuito de analisar e comparar a estabilidade óptica dos compostos de ICG, foram feitos testes em diferentes temperaturas com a ICG, a dICG e a NanoICG, com as amostras a 3,9 µg/mL, após a diluição em PBS e água. Imediatamente após a diluição das amostras foi feita a medida do espectro de absorção das soluções e, em seguida, elas foram estocadas no escuro a 4°C, 25 °C e 37°C por 24 horas. Após esse período, as amostras foram novamente medidas no espectrofotômetro.

4.6.1 NanoICG, dICG e ICG e em PBS

Os gráficos da Figura 37 mostram a termoestabilidade de 24 horas, das soluções de ICG, dICG e NanoICG a 4°C, 25°C e 37 °C. Nos gráficos se encontram os espectros de absorção imediatamente após a diluição e depois de 24 horas das soluções diluídas em PBS. Nas três temperaturas analisadas, tanto a NanoICG quanto a dICG mostram a banda dos agregados-J que perde sua intensidade com o passar do tempo. Já para a ICG, logo após sua diluição, é possível observar a banda representativa da ICG monomérica e da ICG na forma de agregados-J. Contudo, após 24 horas, a ICG mostra não só uma diminuição na amplitude de absorção de luz de suas bandas, mas também uma formação de agregados-J, com o aumento no comprimento de onda de 894 nm. Essa formação fica mais evidente com o aumento da temperatura, como mostra o gráfico em 37 °C da Figura 37-c. Contudo, os fatores que levam à formação de agregados na solução de cianinas não estão relacionados apenas ao aumento de temperatura, mas também à concentração de sais no meio. (103,107)

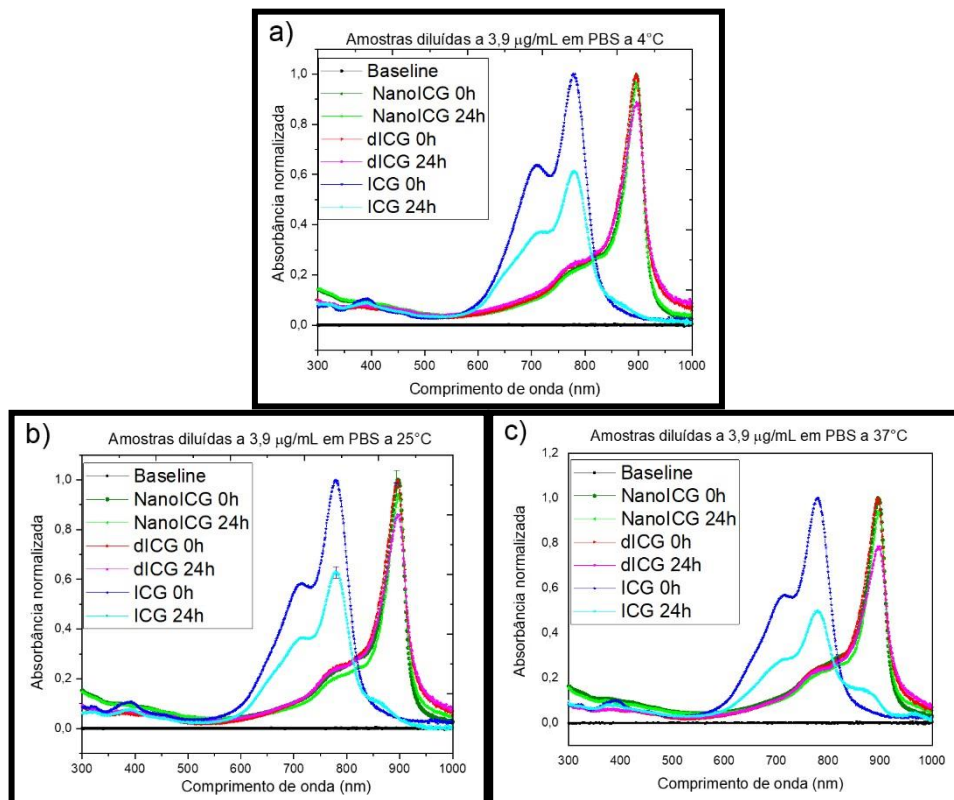


Figura 37 - Estabilidade de 24 horas do espectro de absorção de luz da NanoICG, dICG e ICG a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluídas em PBS deixadas em a) a 4°C em b) a 25°C e em c) a 37°C.

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 38 sumariza os resultados da Figura 37 com um gráfico de redução, em porcentagem comparativa da variação do comprimento de onda com máxima absorção de luz em relação ao inicial das amostras (894 nm para NanoICG e dICG e 780 nm para ICG), após 24 horas, nas diferentes temperaturas. Dentre as soluções diluídas em PBS, a ICG apresentou a menor estabilidade em seu espectro. A 4 °C, a ICG mostrou uma queda de 38,4% na intensidade do comprimento de onda de 780 nm em relação a seu espectro inicial, enquanto a dICG decaiu 12,0% em relação ao momento de sua diluição, no seu ponto máximo de absorção de luz de 894 nm e a NanoICG, apresentou a melhor estabilidade, sendo o maior decaimento apresentado em seu ponto máximo no espectro, de 894 nm, de 3,6%, em relação à amostra da nanoemulsão preparada direto do estoque.

A 25°C, também ocorreu uma maior estabilidade da NanoICG em PBS em relação às outras amostra, com redução de 6,7% em $\lambda = 894\text{nm}$, comparado a 14,6% para a dICG e 37% para a ICG em $\lambda = 780\text{ nm}$, sendo a ICG livre o composto menos estável. Para os testes em 37°C, a NanoICG mostrou-se também pouco sensível à degradação, mantendo um decaimento de 6,3%. A dICG sofreu degradação de 22%, mostrando maior susceptibilidade à degradação

com o aumento de temperatura, enquanto a ICG sofreu sua maior degradação, com 50,3% de decaimento de seu ponto de maior absorção de luz.

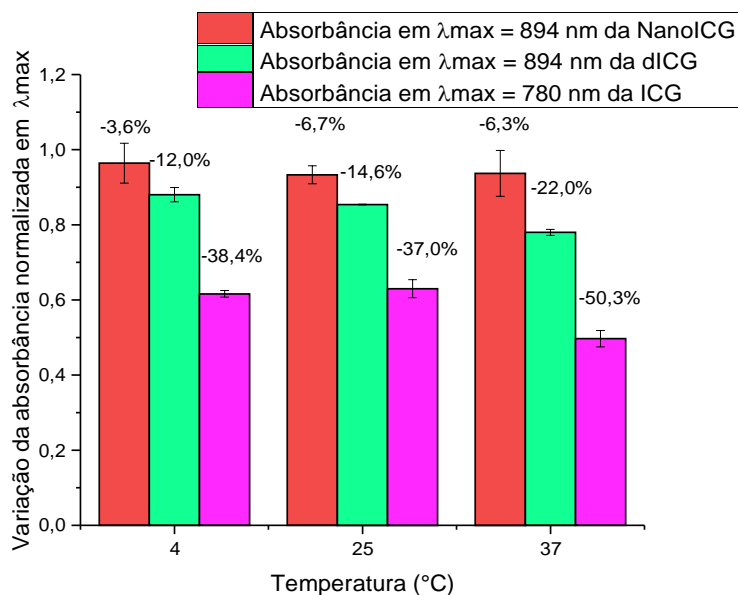


Figura 38 - Absorbância normalizada após 24 horas do ponto máximo de absorção de luz de cada solução em diferentes temperaturas diluídas em PBS.

Fonte: Elaborada pelo autor

A degradação da ICG em soluções aquosas está descrita pela formação de leucoformas com saturação de ligações duplas e fragmentações da molécula. (49,118) Esse tipo de degradação ocorre prevalentemente quando a solução se encontra em concentrações baixas, onde há menor agregação da molécula e maior proporção de monômeros livres. (51) Em contrapartida, um possível motivo da maior estabilidade da dICG e NanoICG são os agregados-J, que são favorecidos em soluções aquosas como o PBS. (103,118)

Pelle *et al.* (2021) testaram a ICG diluída na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ em PBS por 24 horas nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C, chegando à conclusão que houve influência da temperatura na degradação do espectro de absorbância das amostras. A degradação em $\lambda = 780$ nm a 4°C não foi significativa para a amostra, já a 25°C, a degradação foi de 17,8% e a 37°C, foi de 37,1%. (50) A maior concentração de ICG utilizada por Pelle *et al.* em relação aos resultados apresentados na Figura 37, podem explicar a melhora da estabilidade da ICG. Outro fator que pode contribuir na variação da degradação da ICG é a quantidade de oxigênio presente na amostra. Ruttger *et al.* mostrou que a ICG em solventes como o metanol na ausência de luz e oxigênio possuem uma estabilidade alta, devido à ausência de oxigênios singletos que degradam a molécula em solução. (52) Sendo assim, o espectro de absorbância da NanoICG

em baixas concentrações em PBS se mostra mais estável que a ICG sob diferentes temperaturas. Para compreender se a presença de sais na solução afeta a estabilidade das amostras estudadas, foram realizados testes de termoestabilidade nos mesmos parâmetros em H₂O.

4.6.2 NanoICG, dICG e ICG em H₂O

A Figura 39 mostra os resultados de termoestabilidade de 24 horas da ICG, NanoICG e dICG diluídas em H₂O. Nesses testes a dICG se mostrou mais estável que a NanoICG, em contraste com o comportamento observado em PBS. A ICG, novamente, apresentou a menor estabilidade nas três diferentes temperaturas de estocagem. Há uma variação similar na amplitude do ponto de maior absorção de luz da ICG comparado ao que ocorre em PBS. Além disso, a ICG não formou agregados-J como em PBS, possivelmente devido à ausência de sais. (119) Já para as soluções de NanoICG e dICG, há uma grande estabilidade, principalmente próximo aos 4°C.

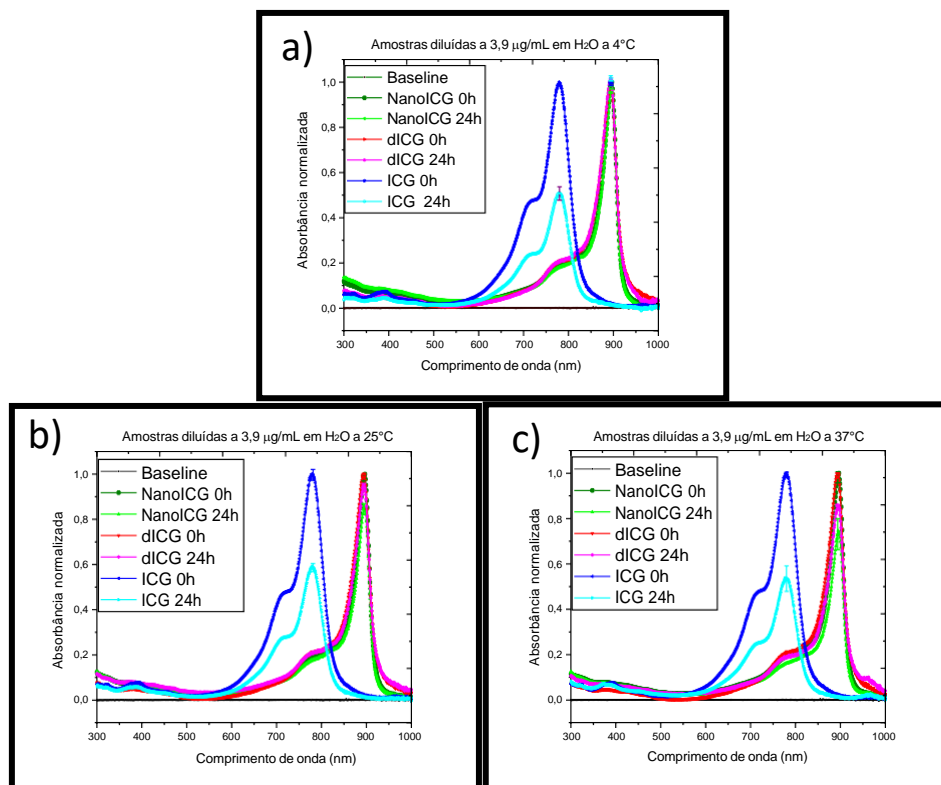


Figura 39 - Estabilidade de 24 horas do espectro de absorção de luz da NanoICG, dICG e ICG a 3,9 mg/mL diluídas em H_2O deixadas em a) a 4°C, em b) a 25 °C e em c) a 37°C.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para mostrar os valores de forma analítica, foi feito os gráficos da Figura 40. A 4°C, a NanoICG sofreu um decaimento de 2,7% enquanto a dICG mostrou um aumento médio de 1,9% da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm. A ICG, por outro lado, sofreu um decaimento de 48,7% em $\lambda = 780$ nm, o que mostra sua maior instabilidade em relação à dICG e à NanoICG.

Quando as amostras foram submetidas a temperatura de 25°C, houve maior estabilidade da dICG, com um decaimento de 4,8% em $\lambda = 894$ nm. A NanoICG sofreu uma diminuição de 14,1% e, novamente, a ICG foi a menos estável, mostrando um decaimento de 40,6% em $\lambda = 780$ nm. Já para a temperatura de 37°C, houve a menor estabilidade da dICG e NanoICG em relação a temperaturas mais baixas. A 37°C, em H_2O , a dICG teve uma redução de seu comprimento de onda de maior absorção de luz em 14,1%, a NanoICG sofreu um decaimento mais significativo de 25,6%, e a ICG decaiu de 46,1%. Apesar da variação entre 40% e 49% de degradação da ICG, em diferentes temperaturas, todos os decaimentos, em 4°C, 25°C e 37°C, não mostraram diferenças significativas comparando a barra de erro, mostrando que a temperatura não influenciou na degradação de absorção de luz dos monômeros da molécula.

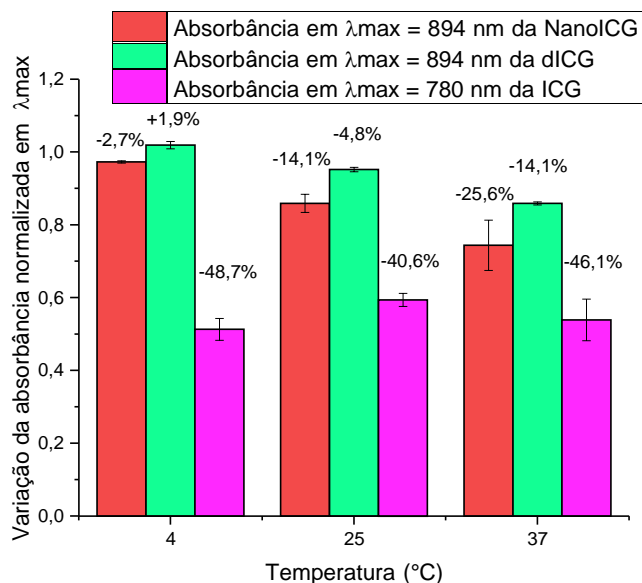


Figura 40 - Absorbância normalizada após 24 horas do comprimento de onda de maior absorção de luz de cada solução em diferentes temperaturas diluídas em H_2O .

Fonte: Elaborada pelo autor

Pelle *et al.* (2021) testaram na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$ soluções de ICG diluídas em água nas temperaturas de 4°C, 25°C e 37°C. Os resultados obtidos mostraram que, a 4°C, não houve degradação banda de 780 nm da cianina, enquanto que a 25°C e 37°C houve degradação de 24,8% e 37,5% na região de maior absorbância da molécula, respectivamente. (50) Outros trabalhos foram feitos correlacionando a degradação da molécula e redução de sua absorbância com a perda de fluorescência da ICG. Mindt *et al.* (2018) utilizou concentrações maiores de diluição da molécula, de 50 $\mu\text{g/mL}$, obtendo dados de degradação de fluorescência da ICG de 1% a 7%, a 4°C, após 24 horas de diluição estocada no escuro. Esse estudo também mostrou a influência do aumento de temperatura e exposição à luz como fatores que influenciavam a degradação da molécula. (43) Fernandez-Fernandez *et al.* (2012) mostrou também que a ICG sofria quedas de, pelo menos, 50% de produção de fluorescência quando estocadas por 24 horas a 4°C em concentrações menores, de 0,625 $\mu\text{g/mL}$. (102) Holzer *et al.* (1998) mostrou que há uma correlação no aumento da concentração de estoque da ICG e a queda de sua degradação. (118) Esses estudos, portanto, corroboram que a concentração é um fator fundamental para a degradação nos testes de estabilidade, sendo que quanto maior a concentração, maior a estabilidade da ICG.

A ICG na forma de agregados-J apresenta menor degradação em relação à sua forma desagregada (118), o que pode explicar a maior estabilidade da dICG e da NanoICG com a presença de agregado J. Outro fator interessante de se comparar entre a ICG, a dICG e a

NanoICG é o modo que interagem com a luz. Saxena *et al.* (2003) mostraram que a ICG possui maior taxa de degradação quando exposta à luz quando comparada ao escuro. (49) Li & Smith (2021) também mostraram que a concentração utilizada da ICG para testes com exposição à luz influencia diretamente na estabilidade e no modo em que a molécula irá se degradar. (51)

Com isso, conclui-se que há melhor estabilidade do espectro de absorção óptico em diferentes solventes da NanoICG e dICG em relação à ICG. Além da vantagem mostrada pela nanoemulsão e pelo dímero de ICG quanto a estabilidade em meios aquosos, foram feitos experimentos para mostrar a capacidade dessas amostras de interagir com a luz, para compreender se essas formulações possuem capacidades fotoativas como a ICG.

4.7 Fotodegradação da NanoICG com variações de solventes e irradiações

A fotodegradação, processo que consiste na degradação através da luz de forma irreversível das propriedades ópticas de uma molécula, pode ocorrer tanto através da formação de ROS na solução, que atacam as próprias moléculas, quanto por ionização das moléculas para estados excitados (S_n) ou tripletos. As cianinas, normalmente, são fotodegradadas por oxigênios singletos. (120)

Para analisar a interação da NanoICG diluída em PBS ou H₂O na concentração de 3,9 µg/mL com a luz, foi feita a fotodegradação das amostras. As fontes de luz utilizadas foram de 2 *lasertables*, uma com lasers de $\lambda = 780$ nm e irradiância de 62,2 mW/cm² e outra com lasers de $\lambda = 808$ nm e irradiância de 119,3 mW/cm². Além disso, foi utilizada uma *biotable* como uma fonte a LED com $\lambda = 850$ nm e irradiância de 32,8 mW/cm².

Cada amostra da NanoICG foi irradiada 10 vezes, sendo que, a cada irradiação, a amostra absorveu a quantidade de 1×10^{19} photons/cm³. Sendo assim, o número total de fótons absorvidos por amostra foi de 1×10^{20} photons/cm³. Os cálculos relacionados ao tempo de irradiação por amostra foram feitos segundo as equações 2, 3 e 4, que levam em conta o comprimento de onda e a irradiância da fonte de luz, assim como a absorbância da amostra.

4.7.1 NanoICG em H₂O

Na Figura 41 é possível observar que a NanoICG, na concentração de 3,9 µg/mL e diluída em H₂O sofre fotodegradação quando iluminada em todos os comprimentos de onda usados. Na Figura 41-a ocorre, com iluminação em $\lambda = 780$ nm, a redução completa da absorção de luz dos agregados-J em $\lambda = 894$ nm da amostra, com uma dose de luz entregue de 155 J/cm²,

sendo a quantidade total de fótons absorvidos de 1×10^{20} fótons/cm³ e a dose de luz por cada ciclo de iluminação de aproximadamente 15,5 J/cm². Já nas Figuras 39-b e 39-c, iluminadas, respectivamente, com $\lambda = 808$ nm e $\lambda = 850$ nm, não ocorre a fotodegradação completa dos agregados-J, apesar do número total de fótons absorvidos pela amostra continuar sendo 1×10^{20} fótons/cm³.

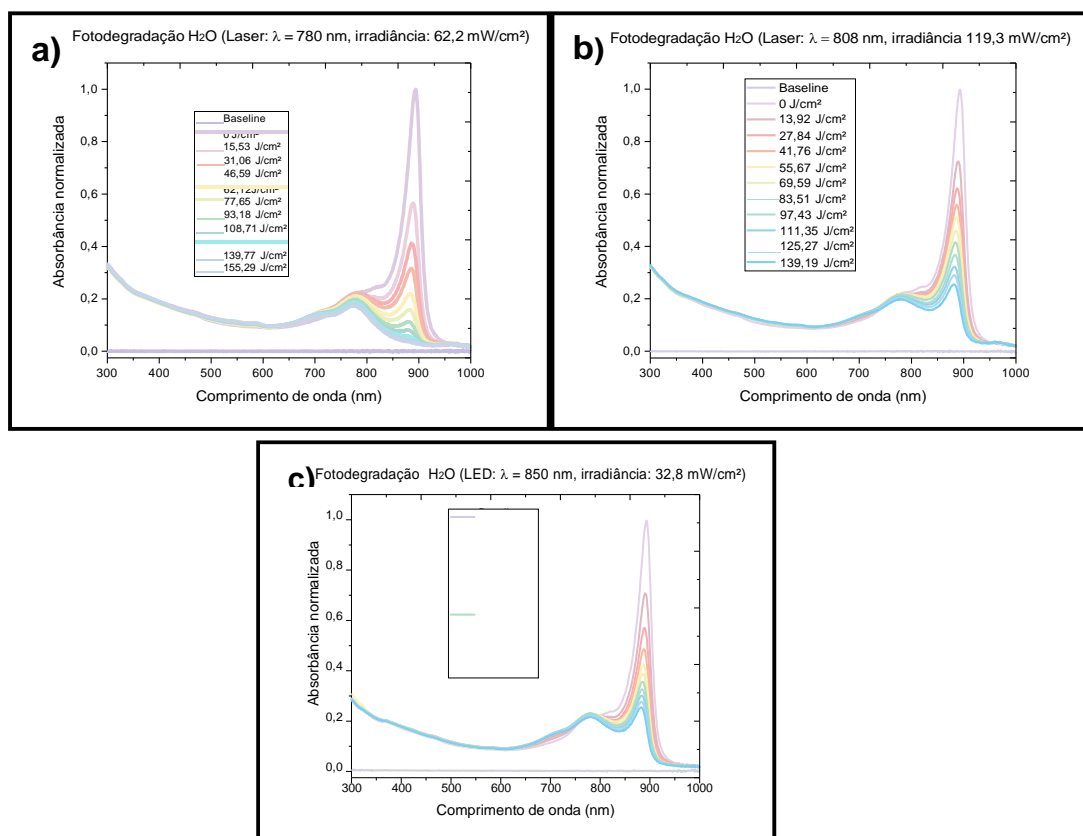


Figura 41 - Fotodegradação da NanoICG 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluída em H_2O irradiada em a) a 780 nm e 62,2 mW/cm², em b) a 808 nm e 119,3 mW/cm² e em c) a 850 nm e 32,8 mW/cm².

Fonte: Elaborada pelo autor

A dose de luz absorvida pela nanoemulsão para $\lambda = 808$ nm e $\lambda = 850$ nm é de 139 J/cm² e 98,4 J/cm², respectivamente, sendo o decaimento em $\lambda = 894$ nm em ambos os casos de aproximadamente 82%. Levando em conta a quantidade de fótons absorvidos pela amostra, conclui-se que a irradiação em 780 nm é a mais eficiente na fotodegradação dos agregados-J da NanoICG em comparação com os outros comprimentos de onda.

Além disso, nos gráficos da Figura 41, é possível observar que há um aumento de intensidade das bandas correlacionadas à dICG livre e dICG na forma de agregados-H com máximos de absorbância nos comprimentos de onda de 780 e 715. Experimentos realizados por

Liu *et al.* em que nanoagregados-J de ICG a concentração de 2,5 µg/mL, irradiados em 808 nm e 1 W/cm², mostram também essa leve tendência para o espectro livre da ICG durante a irradiação. (46) Picchio *et al.* também mostram que agregados-J irradiados em 785 nm e 0,5 W/cm² promovem uma formação da ICG livre, constatando que a diminuição da absorção de luz dos agregados-J em 895 nm alimenta a formação das bandas com máximos de absorção de luz em 780 nm e 715 nm, acusando uma desagregação da molécula. (121)

A partir dos gráficos da Figura 41 foram analisados os valores nas regiões de maior absorção de luz. A Figura 42-a mostra a análise do decaimento em relação a $\lambda = 894$ nm da NanoICG com iluminação nos diferentes comprimentos de onda utilizados. Cada ponto no gráfico significa a absorção de 1×10^{19} fótons/cm³ na solução. Sendo assim, o décimo primeiro ponto em cada linha do gráfico representa a absorção de 1×10^{20} fótons/cm³ pelas amostras. É possível observar que, ao final da absorção dessa quantidade de fótons, a dose de luz entregue à NanoICG é diferente dependendo do comprimento de onda utilizado. Para $\lambda = 850$ nm a dose de luz entregue foi de 98,40 J/cm², para $\lambda = 808$ nm foi de 139,19 J/cm² e para $\lambda = 780$ nm, de 155,29 J/cm². Nessas condições, quando $\lambda = 850$ nm e $\lambda = 808$ nm, há um consumo similar das moléculas absorvedoras de luz em $\lambda = 894$ nm, de aproximadamente 82,5%, ao final da absorção de 1×10^{20} fótons/cm³. Em contrapartida, a fonte de luz de 780 nm mostrou maior capacidade de consumir os agregados-J, com um decaimento $\lambda = 894$ nm de 99,7%.

Na Figura 42-b, há a variação em $\lambda = 780$ nm da NanoICG submetida a irradiações em diferentes comprimentos de onda. Para a dose de luz de 155,29 J/cm² fornecida pela fonte de iluminação de $\lambda = 780$ nm, houve a maior redução em sua absorção de luz, valor de aproximadamente 23%, enquanto com a iluminação da fonte de $\lambda = 808$ nm houve um decaimento de aproximadamente 11% de intensidade desse comprimento de onda. Em contraste, com o uso da fonte de 850 nm, ocorreu, inicialmente, um aumento na absorção de luz em $\lambda = 780$ nm com as sucessivas iluminações, e após a entrega de 98,4 J/cm², a absorbância final da amostra se tornou semelhante a absorbância inicial. Em outros trabalhos envolvendo agregados-J de ICG e fotodegradação, como de Picchio *et al.* e Liu *et al.*, é possível observar a formação da banda monomérica da ICG com um máximo de absorção de luz em $\lambda = 780$ nm com a iluminação de soluções com os agregados-J. (46,121)

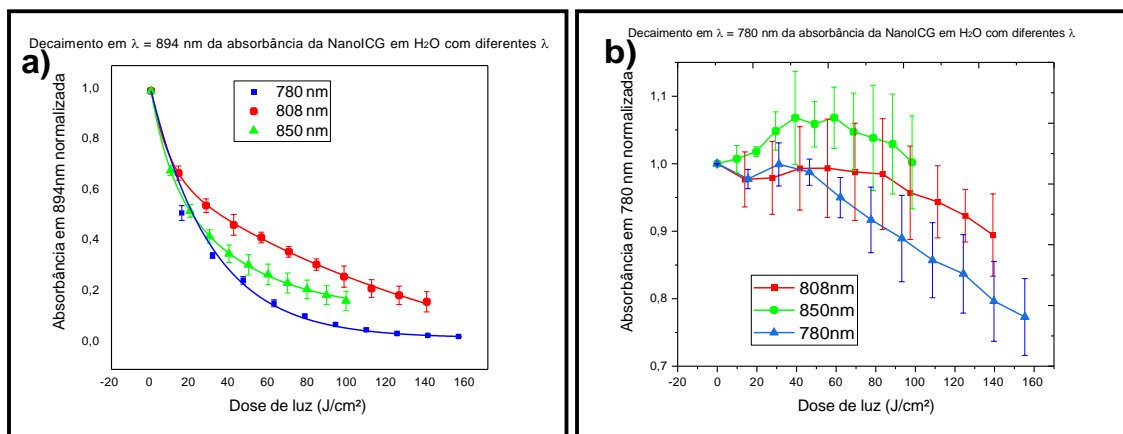


Figura 42 - Decaimento normalizado da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm em a) da NanoICG irradiada com os comprimentos de onda em 780 nm, 808 nm e 850 nm. NanoICG irradiada em b) mostrando o comportamento da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm da NanoICG irradiada em 780 nm, 808 nm e 850 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Além disso, há uma diferente taxa de degradação ou formação da banda dos monômeros levando-se em conta o comprimento de onda utilizado na iluminação da amostra. Quando utilizada a fonte de luz de 850 nm, ocorre menor diminuição da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm, ponto máximo da banda dos dímeros de ICG livres, mas, com o uso de fontes mais próximas ao comprimento de onda de maior absorção de luz da molécula livre, como a de $\lambda = 808$ nm, e, especialmente, a de $\lambda = 780$ nm, ocorre maior degradação do espectro de absorção de luz nessa região. Isso pode se correlacionar com uma maior taxa de absorção de fótons da dICG livre em regiões em que há maior absorção de luz. (52) Para analisar a estabilidade e o comportamento dos agregados-J, que são mais propensos a existir em soluções com sais (103), foram feitos testes de fotodegradação da NanoICG diluída em PBS.

4.7.2 NanoICG em PBS

Os testes realizados de fotodegradação da NanoICG em PBS na concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ foram realizados sob os mesmos parâmetros de iluminação e número de fótons absorvidos que os testes realizados na seção anterior (4.7.1) com a fotodegradação em H₂O.

A figura 43 mostra que houve uma diminuição dos valores das bandas de absorção de luz da NanoICG, após absorver um total de 1×10^{20} fótons/cm³, com a iluminação em qualquer dos 3 comprimentos de onda analisados, 780 nm, 808 nm e 850 nm. Para a análise da fotodegradação dos agregados-J com a fonte de luz com $\lambda = 780$ nm, foi possível observar uma diminuição da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm de aproximadamente 95%, com dose de luz de

163,58 J/cm² (Figura 43-a). Para a amostra irradiada com $\lambda = 808$ nm, houve um decaimento de aproximadamente 91%, após a entrega de 147,93 J/cm² (Figura 43-b) e, quando irradiada com $\lambda = 850$ nm, houve um decaimento de aproximadamente 82% com 97,2 J/cm². Levando-se em conta a quantidade de fótons absorvidos pela amostra, o comprimento de onda que foi mais eficaz na fotodegradação dos agregados-J da NanoICG foi de $\lambda = 780$ nm.

Além disso, nas Figuras 41-a, 41-b e 41-c, é possível observar, comparando-se com a fotodegradação H₂O, que há menor tendência da formação do espectro livre da dICG, com presença pouco evidente das bandas de absorção de luz com máximos em torno de 780 nm e 715 nm. Isso mostra que o PBS, como já descrito na literatura, é um solvente mais favorável para a existência dos agregados-J. (103)

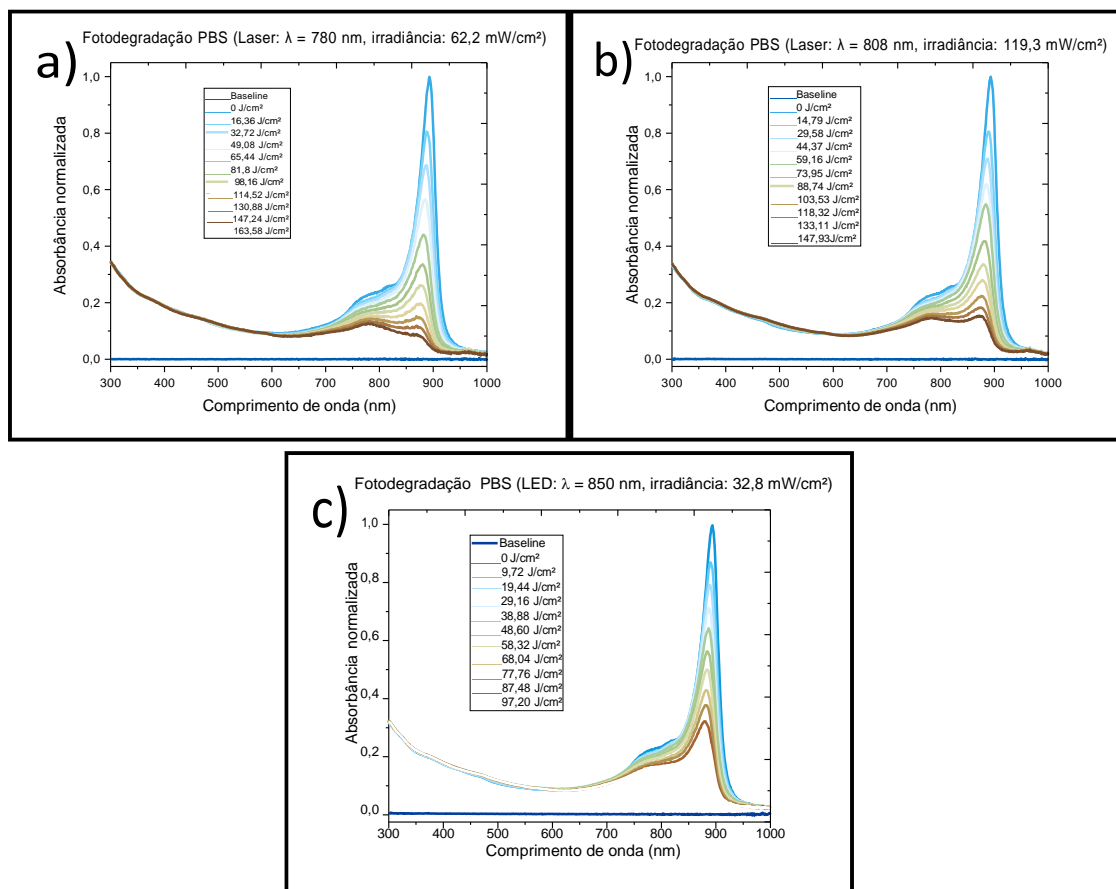


Figura 43 - Fotodegradação da NanoICG 3,9 µg/mL diluída em PBS irradiada em a) 780 nm e 62,2 mW/cm², em b) 808 nm e 119,3 mW/cm² e em c) 850 nm e 32,8 mW/cm².

Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar de haver, para os 3 comprimentos de onda analisados, uma variação diferente na amplitude de absorção de luz dos agregados-J da NanoICG após a absorção de 1×10^{20} fótons/cm³, outro comportamento se observa quando a fotodegradação ocorre baseada na dose de luz entregue à amostra em relação aos valores de absorção normalizados com o valor inicial.

A Figura 44-a mostra que, quando se leva em conta a dose de luz utilizada para a irradiação das amostras, o comportamento de fotodegradação dos agregados-J ocorre numa taxa similar para os 3 comprimentos de onda.

A Figura 44-b mostra que, para a absorção de luz em $\lambda = 780$ nm, a taxa de decaimento ocorre de forma similar quando irradiadas com aproximadamente 100 J/cm^2 em $\lambda = 850$ ou 780 nm. Além disso, para a mesma região absorvedora de luz, a iluminação em $\lambda = 808$ nm mostrou menor taxa de fotodegradação após a entrega de aproximadamente 150 J/cm^2 de dose de luz. Contudo, se for levado em conta a absorção dos fótons pelas amostras, a irradiação no comprimento de onda de 780 nm mostra maior fotodegradação da dICG livre em relação aos outros comprimentos de onda. Após a absorção do mesmo número de fótons, ocorre uma fotodegradação de aproximadamente 45% da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm quando iluminada com $\lambda = 780$ nm, de aproximadamente 35% do mesmo comprimento de onda quando iluminada com a fonte de 808 nm e de 27% de diminuição de absorção de luz em $\lambda = 780$ nm da amostra com o uso da fonte de 850 nm.

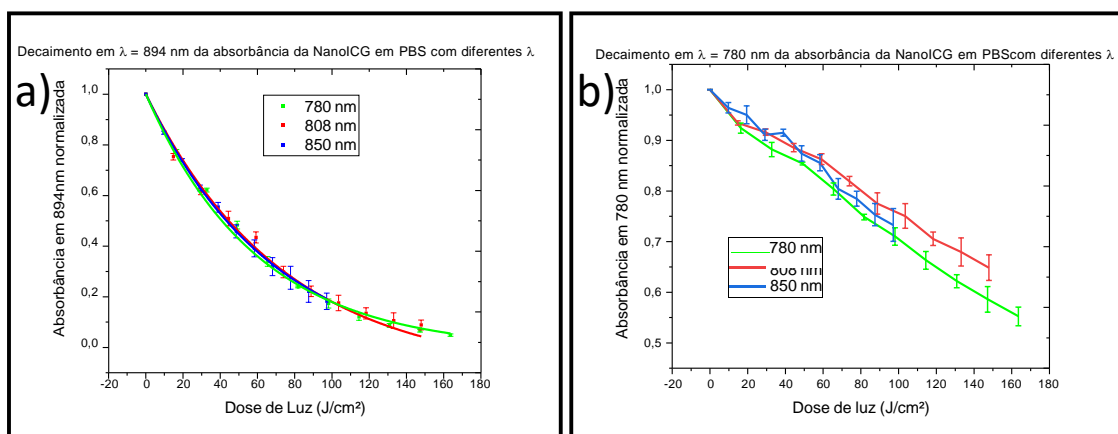


Figura 44 - Decaimento normalizado da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm em a) da NanoICG irradiada com os comprimentos de onda de em 780 nm, 808 nm e 850 nm. Decaimento normalizado da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm em b) da NanoICG irradiada com os comprimentos de onda de em 780 nm, 808 nm e 850 nm.

Fonte: Elaborada pelo autor

Assim, a NanoICG a $3,9 \mu\text{g/mL}$ sofre maior fotodegradação de seus agregados-J quando irradiada em $\lambda = 780$ nm em comparação aos outros comprimentos de onda utilizados. Quando a fotodegradação foi realizada em H_2O , houve o aumento de sua absorção de luz na banda referente ao espectro livre da dICG, como também foi visto por Picchio *et al.* e Liu *et al.* com o uso de agregados-J de ICG. (46,121) Além disso, a iluminação em $\lambda = 780$ nm foi capaz de degradar com mais eficiência os agregados-J e a dICG livre, com máximos de absorção de luz

em 894 nm e 780 nm, respectivamente. Em PBS, com a maior estabilidade dos agregados-J, ocorreu uma fotodegradação, levando em conta a dose de luz entregue, com taxa similar na absorvância dos agregados-J da nanoemulsão para os três comprimentos de onda testados. Mas, levando em conta a quantidade de fótons absorvidos, a irradiação em $\lambda = 780$ nm se manteve mais eficaz.

Como a NanoICG foi capaz de absorver luz em todos os comprimentos de onda analisados, foram feitos testes analisando sua capacidade de absorção de luz em $\lambda = 810$ nm em alta irradiância, de 1 W/cm^2 e em diferentes concentrações.

4.8 Fotodegradação 1 W/cm^2 e 810 nm

Foi realizado a fotodegradação a 1 W/cm^2 e 810 nm da ICG, dICG e NanoICG em concentrações baixas, de $3,9\ \mu\text{g/mL}$ e altas, de $156\ \mu\text{g/mL}$ em PBS e H_2O . Com isso, foi possível comparar o efeito de absorção de luz e resistência à fotodegradação das amostras. Neste experimento, as doses de luz foram entregues em 6 frações de $100\ \text{J/cm}^2$, totalizando $600\ \text{J/cm}^2$ de dose de luz entregue. Foi possível observar também o efeito da concentração de sais nos espectros de absorção da luz e da concentração molecular das amostras na taxa de fotodegradação.

4.8.1 ICG

A Figura 45 mostra os espectros com a fotodegradação da ICG na concentração de $3,9\ \mu\text{g/mL}$ em PBS (Figura 45-a) e em H_2O (Figura 45-b). Houve maior tendência de formação dos agregados-H da ICG na solução diluída em PBS, expresso pelo aumento sua banda de absorção de luz com máximo em 715 nm, quando comparada a amostra diluída em H_2O , 43-b. Além disso, houve queda de aproximadamente 75% na absorção de luz em $\lambda = 780$ nm após a entrega de $100\ \text{J/cm}^2$ e de 95% após $600\ \text{J/cm}^2$. Na fotodegradação realizada em H_2O , mostrada na Figura 45-b, houve uma fotodegradação de aproximadamente 85% em $\lambda = 780$ nm na banda dos monômeros de ICG, após a absorção de $100\ \text{J/cm}^2$, e de aproximadamente 97 % após a absorção de $600\ \text{J/cm}^2$ de dose de luz.

A fotodegradação também foi feita em concentrações maiores da ICG, de $156\ \mu\text{g/mL}$, tanto em PBS quanto em H_2O , mostrados nas Figuras 43-c e 43-d. É possível perceber, no decorrer da fotodegradação da ICG em PBS (Figura 45-c), uma maior proporção de agregados-H, na banda com máximo em 715 nm, e agregados-J, na banda com máximo em 894 nm,

comparado à fotodegradação da ICG em H₂O (Figura 45-d). Após a absorção de 100 J/cm² de dose de luz, ocorreu uma diminuição de em torno de 13% da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm e, após a absorção de 600 J/cm², a diminuição foi de 55%. Já na fotodegradação feito em H₂O da ICG 156 μ g/mL ocorreu uma redução de aproximadamente 3% da absorção de luz em $\lambda = 780$ nm, após a absorção de 100 J/cm², e uma fotodegradação de aproximadamente de 40% da mesma região espectral após a absorção de 600 J/cm². Além disso, na Figura 45-d não há variações na formação de agregados em 894 nm e 715 nm com a fotodegradação como é o comportamento em PBS mostrado na Figura 45-c.

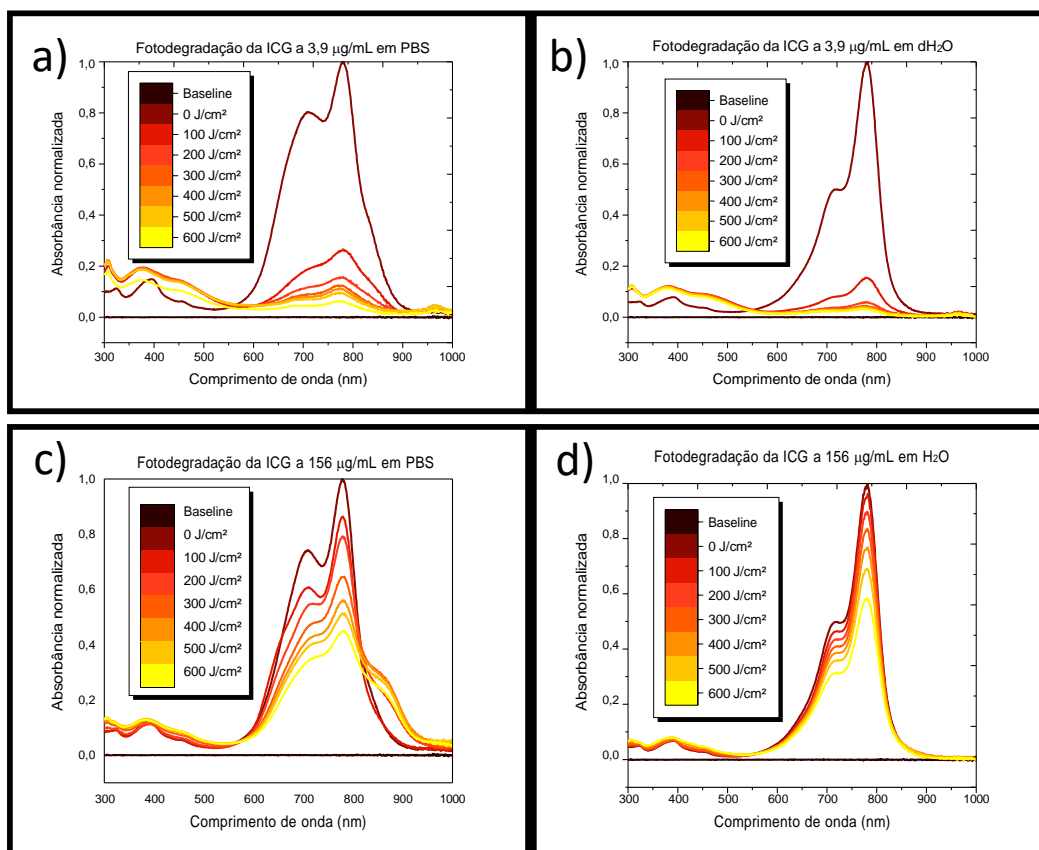


Figura 45 - Fotodegradação da ICG em a) diluída em 3,9 μ g/mL em PBS, em b) diluída em 3,9 μ g/mL em H₂O, em c) diluída em 156 μ g/mL em PBS e em d) em 156 μ g/mL em H₂O.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os motivos que causaram a formação dos agregados-H e agregados-J presentes em Figuras 43-a e 43-c estão relacionados às características do solvente, como solubilidade e presença de sais. (46,103) Além disso, com as irradiações das amostras, foi possível observar a produção de vapor nas cubetas, acusando o aquecimento da solução, o que favorece a formação de agregados-J. (46,103)

Existem dados passíveis de comparação na literatura com as fotodegradações realizadas em baixas concentrações. Dentre as comparações está o trabalho de Pelle *et al.* que realizou a fotodegradação da ICG diluída na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ em PBS e irradiada a 1 W/cm^2 e 808 nm, com uma redução de em torno de 70% de absorção de luz em $\lambda = 780$ nm com a dose de luz de 300 J/cm^2 (50), taxa mais lenta que os resultados apresentados nas mesmas condições e mostrados na Figura 45-a. Em 2021, Su *et al.* mostraram que a ICG na concentração de 7,8 $\mu\text{g/mL}$ e irradiada em 785 nm e 0,5 W/cm^2 , recebendo um total de 300 J/cm^2 de dose de luz, sofreu uma fotodegradação de mais de 90% no ponto de maior absorção de luz da amostra. (122) Já Liu *et al.*, em 2017, mostrou que a ICG em concentração mais baixa, de 2,5 $\mu\text{g/mL}$ e irradiada a 1 W/cm^2 em 808 nm com uma dose de luz de 900 J/cm^2 sofreu um consumo em seu ponto máximo de absorção de luz de aproximadamente 80%. (46) O resultado da fotodegradação mostrado na Figura 45-b após a entrega de 300 J/cm^2 foi uma fotodegradação de 96% da amostra, mostrando maior fotodegradação do que a encontrada por Liu *et al.*, mas que corrobora com os experimentos de Su *et al.* na taxa de fotodegradação. (46,122)

Quanto à fotodegradação realizado em concentrações mais altas, é possível observar maior dificuldade nos decaimentos da intensidade de absorção de luz máxima para a mesma dose de luz entregue em relação às Figuras 43-a e 43-b. Pelle *et al.*, (2021) mostraram em experimentos com a ICG diluída PBS nas concentrações de 19,5 $\mu\text{g/mL}$ e 39 $\mu\text{g/mL}$ a correlação entre o aumento da concentração da molécula com uma menor fotodegradação do percentual em $\lambda = 780$ nm após a irradiação em 1 W/cm^2 e 808 nm com uma dose de luz de 300 J/cm^2 . A amostra diluída a 19,5 $\mu\text{g/mL}$ teve sua região de maior absorção de luz degradada em aproximadamente 40% e a diluída 39 $\mu\text{g/mL}$ sofreu uma degradação no seu máximo de aproximadamente 15%. (50) Já Clutter *et al.*, em 2021, utilizando-se da ICG em H_2O na concentração de 58,5 $\mu\text{g/mL}$, mostrou que com a entrega de 540 J/cm^2 de dose de luz irradiada em 785 nm houve uma fotodegradação de aproximadamente 80% em $\lambda = 780$ nm. (123) As fotodegradações apresentadas nas Figuras 43-c e 43-d mostraram um decaimento entre 40% e 60% em $\lambda = 780$ nm, resultado situado entre os valores apresentados por Clutter *et al.* e Pelle *et al.*, mas com diferentes parâmetros de concentração e iluminação. (50,123)

A Figura 46 mostra o gráfico de decaimento de absorção de luz em $\lambda = 780$ nm em relação à dose de luz entregue. É possível observar que, na concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$, em PBS e H_2O , ocorreu uma taxa de fotodegradação maior nos primeiros 100 J/cm^2 entregues com aproximadamente 80% de diminuição na absorção luminosa em $\lambda = 780$ nm. Para concentrações 40 vezes maiores, de 156 $\mu\text{g/mL}$, ocorreu uma fotodegradação mais lenta e homogênea a cada

dose de luz entregue. A fotodegradação da banda dos monômeros da ICG, a 156 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O , ocorreu de forma mais lenta do que em PBS. Contudo, houve a formação de outros agregados no processo de fotodegradação da ICG, em PBS, ou seja, uma parte dos monômeros da ICG se agregaram e deslocaram sua banda de absorção óptica. Além disso, Weigand *et al.* mostraram que os agregados de ICG possuem menor capacidade de absorver a luz que os monômeros livres, devido a diminuição da superfície das moléculas. (105)

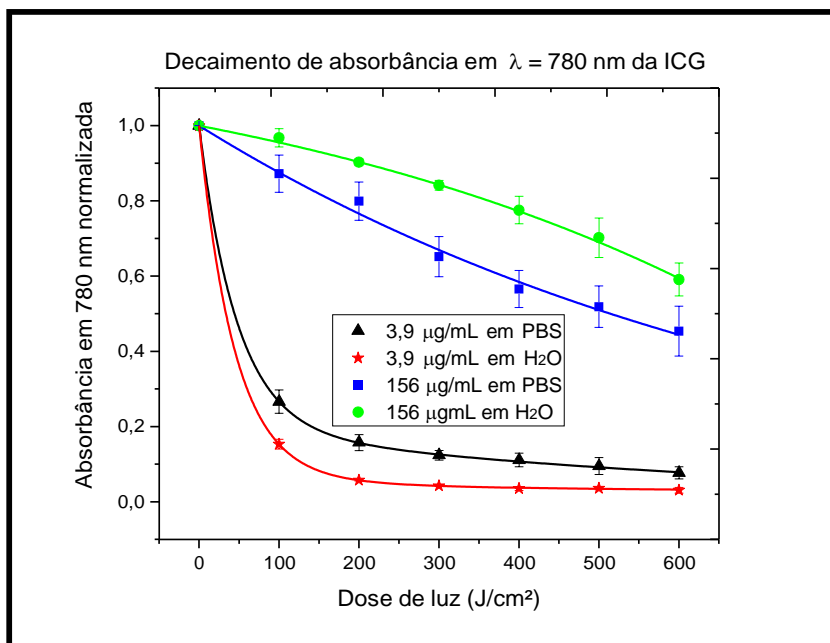


Figura 46 - Decaimento da absorção óptica em $\lambda = 780 \text{ nm}$ da ICG em diferentes nas concentrações 3,9 $\mu\text{g/mL}$ ou 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS ou H_2O .

Fonte: Elaborada pelo autor

A ICG possui a característica de sofrer uma fotodegradação em suas bandas de absorção de luz mais lenta com o aumento de sua concentração. A menor taxa de fotodegradação em concentrações mais altas podem ser relacionadas ao maior número de moléculas presentes na solução. Isso irá dificultar a queda percentual das bandas de absorção de luz devido a necessidade de maior energia para fotodegradar um maior número de moléculas por irradiação. Além disso, a ICG possui a tendência de formação de agregados após a iluminação quando diluída em meios menos solúveis como o PBS, em relação à água destilada. Tanto os sais do PBS quanto o aumento da temperatura da solução promovem a formação de agregados-J. (46,103) Para investigar as propriedades dos dímeros de ICG foram feitas as fotodegradações nos mesmos parâmetros da ICG livre.

4.8.2 dICG

A Figura 47 mostra os espectros durante a fotodegradação em 810 nm a 1 W/cm² da dICG, na concentração de 3,9 µg/mL em PBS e em H₂O (Figuras 45-a e 45-b, respectivamente) e na concentração de 156 µg/mL em PBS e H₂O (Figuras 45-c e 45-d). Não havia dados reportados na literatura sobre a fotodegradação dos dímeros da ICG. É possível observar os agregados-J mostrados na Figura 47, devido ao seu estoque em solução aquosa de mais de um mês prévio ao uso.

A taxa de fotodegradação foi similar em ambos os solventes das Figuras 45-a e 45-b. Em PBS, houve um decaimento de aproximadamente 80% da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm da amostra após a entrega de 100 J/cm² de dose de luz, e um decaimento próximo a 100% após os 600 J/cm². Um comportamento similar foi observado para H₂O, em que aproximadamente 84% da absorção de luz da amostra no mesmo comprimento de onda foi degradado após 100 J/cm² e, aproximadamente, 99% da absorção de luz da amostra foi fotodegradada após a entrega de 600 J/cm².

As fotodegradações realizadas na concentração de 156 µg/mL estão descritas na Figura 47-c, em que a dICG está diluída em PBS e Figura 47-d, em H₂O. Em PBS houve a fotodegradação em $\lambda = 894$ nm de aproximadamente 20% da amostra após a entrega de 100 J/cm² e de aproximadamente 50% com 600 J/cm². Para a molécula diluída em H₂O houve um decaimento da mesma região espectral de, aproximadamente, 15% e 45% após a absorção de 100 e 600 J/cm², respectivamente.

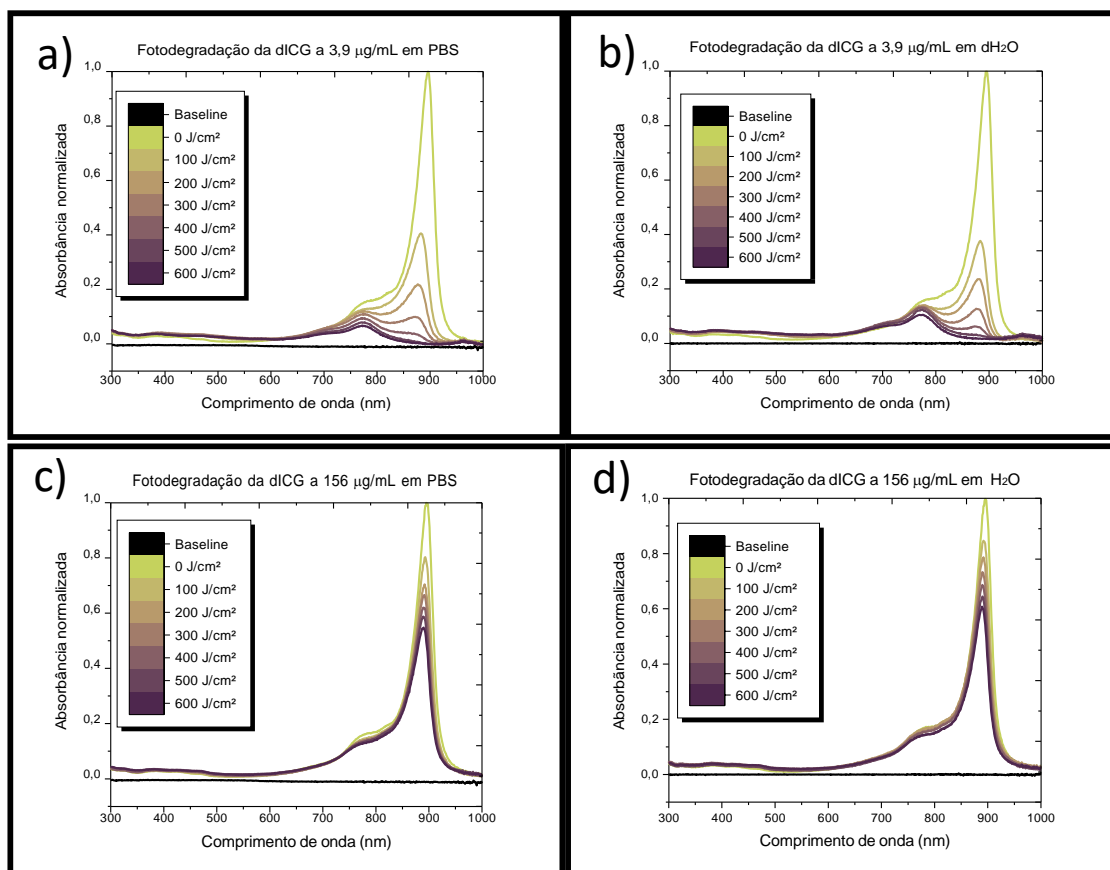


Figura 47 - Fotodegradação da dICG em a) diluída em 3,9 µg/mL em PBS, em b) diluída em 3,9 µg/mL em H_2O , em c) diluída em 156 µg/mL em PBS e em d) em 156 µg/mL em H_2O .

Fonte: Elaborada pelo autor

Sabe-se que agregados-J da ICG são fotodegradados quando irradiados em comprimentos de onda em torno de 800 nm. Estudos com agregados-J da ICG em 2,5 µg/mL feitos por Liu *et al.* (2017), mostraram a fotodegradação da molécula com redução da absorção de luz em $\lambda = 895$ nm em aproximadamente 75% após a absorção de 600 J/cm² de luz em 808 nm e 1 W/cm². (46) Os experimentos realizados com agregados-J da dICG mostraram uma queda mais acentuada na absorção óptica em $\lambda = 894$ nm após de receber a mesma dose de luz. Contudo, comparando-se as Figuras 43 e 45, é possível observar uma taxa de queda similar nos respectivos máximos de absorbância das amostras. Isso mostra que a ICG em sua forma livre ou a dICG em sua forma de agregados-J, quando na mesma concentração e irradiadas em 810 nm, sofrem um comportamento semelhante na queda de seus respectivos máximos no espectro de absorção de luz.

Os gráficos da Figura 47 mostraram que os solventes H_2O e PBS não influenciaram na formação de novos agregados entre as soluções com o passar das irradiações. Além disso, a

foto-degradação ocorreu de forma similar para soluções de mesma concentração, como mostram as curvas de decaimento da Figura 48. É possível observar que as foto-degradações da dICG em H₂O e em PBS, a 3,9 µg/mL, se mostram com uma mesma taxa, dentro da faixa do erro, no decaimento de absorção de luz pelos agregados-J. Da mesma maneira, a foto-degradação da dICG, a 156 µg/mL em H₂O e em PBS, mostram o decaimento em taxas sem diferença significativa entre elas.

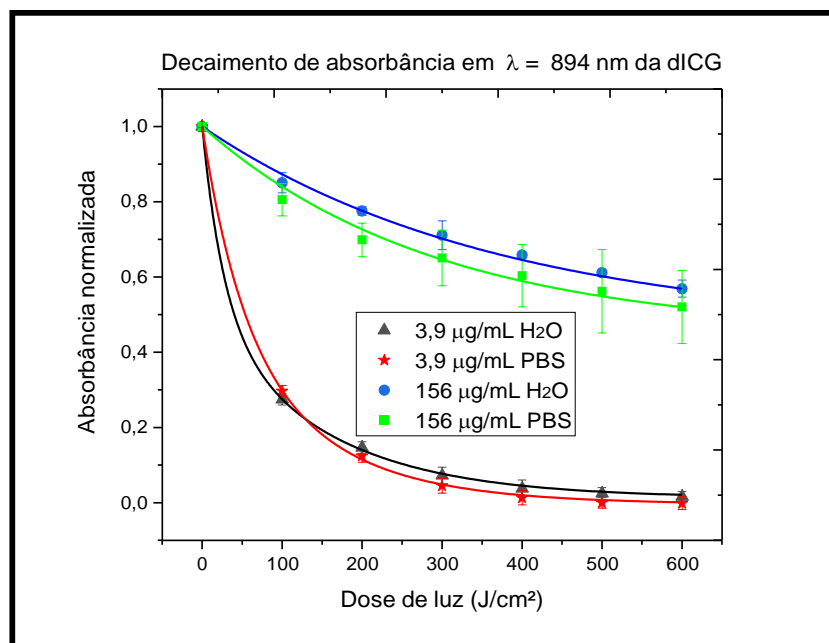


Figura 48 - Decaimento de absorção de luz em $\lambda = 894$ nm da dICG em diferentes nas concentrações 3,9 µg/mL ou 156 µg/mL em PBS ou H₂O.

Fonte: Elaborada pelo autor

O comportamento da foto-degradação da dICG apresentou similaridades com a ICG quando irradiada a 810 nm. Ambas as amostras possuem maior fotoestabilidade na concentração de 156 µg/mL em relação a 3,9 µg/mL. Após a absorção de 600 J/cm^2 , ambas sofreram uma foto-degradação parcial, de em torno de 50%, em seus respectivos máximos quando na concentração de 156 µg/mL e uma foto-degradação próxima de 100% na concentração de 3,9 µg/mL. Enquanto a ICG mostrou um comportamento diferente quanto aos agregados formados na solução dependendo do solvente utilizado, a dICG mostrou uma região de absorção de luz máxima similares nos dois solventes utilizados. Para investigar o comportamento de absorção de luz da dICG na forma de nanoemulsão foram feitos testes de foto-degradação da nanoICG sob as mesmas condições anteriores.

4.8.3 NanoICG

A NanoICG foi diluída nas concentrações de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ como mostra a Figura 49-a e 47-b, em PBS e H_2O , respectivamente, e na concentração de 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS e H_2O , Figura 49-c e 49-d, respectivamente. É possível observar que, após receber 100 J/cm^2 , a absorção de luz em $\lambda = 894 \text{ nm}$ da NanoICG diluída em PBS sofreu uma diminuição de aproximadamente 70%, e após receber 600 J/cm^2 , a queda se aproximou dos 100%. Os comportamentos dos decaimentos da NanoICG também foram similares em H_2O , sendo em torno de 70% e 100%, após a absorção de 100 e 600 J/cm^2 , respectivamente.

Na concentração de 156 $\mu\text{g/mL}$, a fotodegradação da NanoICG, quando diluída em PBS ou em H_2O , também ocorre com taxas similares entre si e ambas mostraram maior fotodegradação do que na concentração de 3,9 $\mu\text{g/mL}$. Em ambos os solventes, após a absorção de 100 J/cm^2 , ocorreu a queda na absorção de luz em $\lambda = 894 \text{ nm}$ de aproximadamente 15% e, após a absorção de 600 J/cm^2 , a queda foi entre 35% e 40%. Com isso, a NanoICG mostrou maior resistência à fotodegradação comparada à dICG e à ICG na concentração de 156 $\mu\text{g/mL}$.

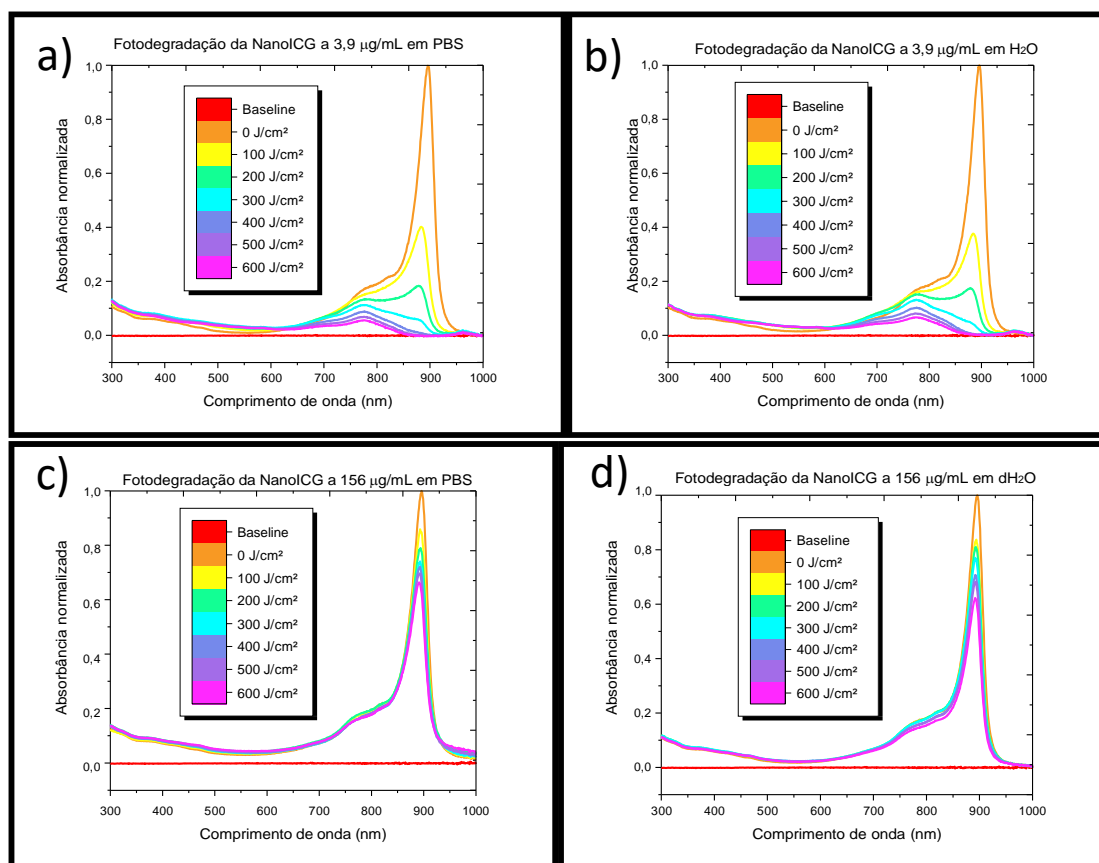


Figura 49 - Fotodegradação da NanoICG em a) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em PBS, em b) diluída em 3,9 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O , em c) diluída em 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS e em d) em 156 $\mu\text{g/mL}$ em H_2O .

Fonte: Elaborada pelo autor

A Figura 50 mostra o decaimento absorção de luz em $\lambda = 894$ nm normalizado a partir da condição inicial para as duas concentrações em PBS e H₂O. Fica ainda mais claro o comportamento similar da fotodegradação do pico de 894 nm da NanoICG a 3,9 $\mu\text{g/mL}$ diluída em PBS e H₂O, com valores dentro das barras de erro. Em relação a NanoICG a 156 $\mu\text{g/mL}$, o comportamento mostrou maior resistência a fotodegradação comparado a menor concentração, tanto em PBS quanto em água destilada, e comportamentos próximos de decaimento.

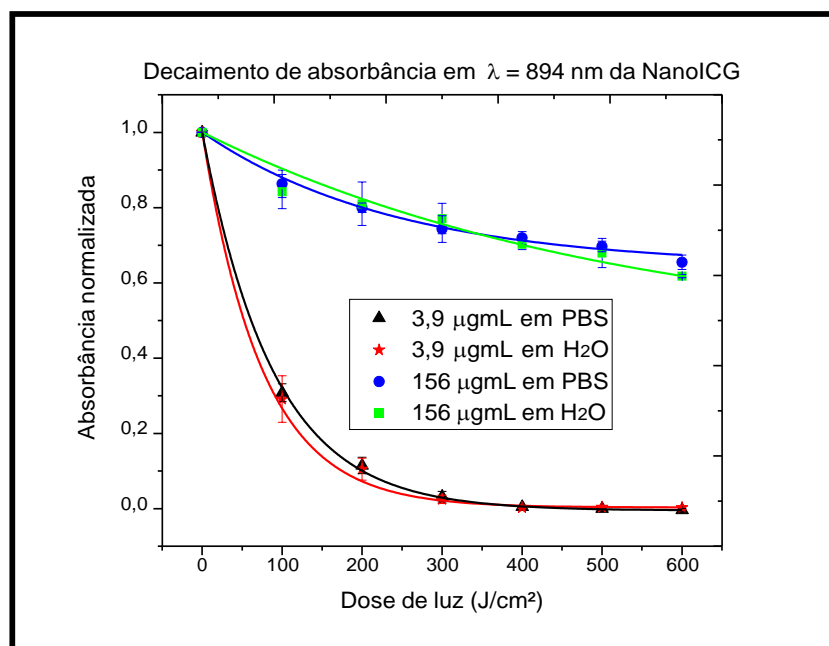


Figura 50 - Decaimento da absorção de luz em $\lambda = 894$ nm da NanoICG em diferentes nas concentrações 3,9 $\mu\text{g/mL}$ ou 156 $\mu\text{g/mL}$ em PBS ou H₂O.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os três tipos de amostras utilizadas, ICG, dICG e NanoICG, sofreram fotodegradação tanto em concentrações mais baixas, quanto mais altas no mesmo comprimento de onda, 810 nm, apesar de possuírem bandas distintas de absorção de luz. Além disso, foi possível observar a diminuição da fotodegradação com o aumento da concentração das amostras, sendo a NanoICG a amostra que menos sofreu fotodegradação para a concentração de 156 $\mu\text{g/mL}$. Sabendo da capacidade de tanto a ICG quanto a dICG em seu estado livre ou de nanoemulsão de absorverem luz, foram feitos testes para compreender o potencial de geração de calor, assim como a durabilidade dessa produção através de testes de fotoestabilidade das moléculas.

4.9 Caracterização fototérmica e de fotoestabilidade

Após observar a existência da capacidade da ICG e da NanoICG na concentração de 156 µg/mL de absorverem a luz em $\lambda = 810$ nm e 1 W/cm², foram feitos testes das propriedades de produção de calor das amostras após irradiações e também sua característica de fotoestabilidade.

4.9.1 Potencial fototérmico

Para correlacionar a fotodegradação da NanoICG e da ICG com a produção de calor gerada pelas moléculas, foi feita a irradiação das amostras por 10 minutos em 1 W/cm² e 810 nm na concentração de 156 µg/mL e diluídas em H₂O ou H₂O com 0,1% de triton x-100. A utilização do triton X-100 se dá pois ele é um detergente, que facilita a desagregação das moléculas agregadas. Liu *et al.* (2017) mostraram que, utilizando detergentes, entre eles o Triton X-100 na concentração de 0,1%, os agregados-J da ICG se desagregam completamente para seu espectro de formação livre após 2 horas sob agitação a 37 °C. (46) (como o detergente funciona

A Figura 51 mostra que tanto a NanoICG quanto a ICG obtiveram aumentos similares de temperatura, tanto em H₂O quanto em H₂O com 0,1% Triton X-100. O experimento mostrou que ambas as moléculas, nos dois solventes utilizados, foram capazes de produzir calor, chegando a temperaturas próximas a 70°C. A variação de temperatura foi em torno de 45°C, após a absorção de 600 J/cm² em 810 nm. Maziukiewicz *et al.* (2019) mostraram que utilizando um laser de 2 W e ICG em concentrações entre 50 µg/mL e 200 µg/mL, o aumento de temperatura encontrado na amostra foi em torno de 50 °C. (124) Picchio *et al.* (2021) mostraram que, apesar da ICG e os agregados-J da ICG produzirem uma quantidade similar de calor, com um laser de 500 mW e comprimento de onda de 780 nm, os agregados-J da ICG se mostram capazes de produzir calor por mais tempo, sendo mais fotoestáveis. (121)

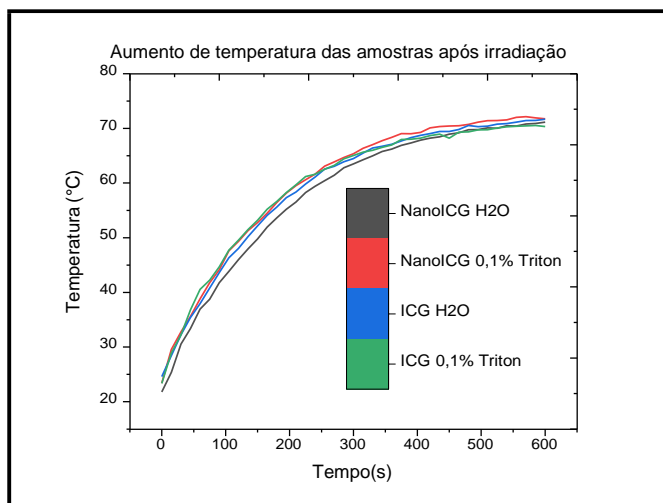


Figura 51 - Aumento de temperatura de amostras da ICG e NanoICG em 156 $\mu\text{g/mL}$ e 1 mL em diferentes solventes irradiadas com laser em 810 nm e 1 W/cm^2 .

Fonte: Elaborada pelo autor

Com os dados apresentados é possível observar que os dímeros de ICG tanto em sua forma desagregada quanto em sua forma de agregados-J em nanoemulsão, foram tão eficientes quanto a ICG na fototermia. Isso mostra que mesmo com a dimerização da cianina, a propriedade de produção de calor com o aquecimento da dICG se mantém similar à ICG. Para caracterizar a fotoestabilidade dos compostos analisados, foram feitos testes correlacionando o tempo de produção de calor da amostra com a fotodegradação dos espectros de absorção.

4.9.2 Testes de fotoestabilidade com ciclos de irradiação periódicos

Para analisar a fotoestabilidade, a solução contendo ICG ou NanoICG na concentração de 39 $\mu\text{g/mL}$ foi exposta à períodos com e sem iluminação com $\lambda=810$ nm e irradiância de 1 W/cm^2 . A irradiação ocorreu com 7 ciclos de 180 s de iluminação e 360 s sem iluminação. A temperatura foi monitorada por uma câmera termográfica a cada 15 segundos. O perfil de irradiação do laser ocorreu com ciclos esquematizados na Figura 52.

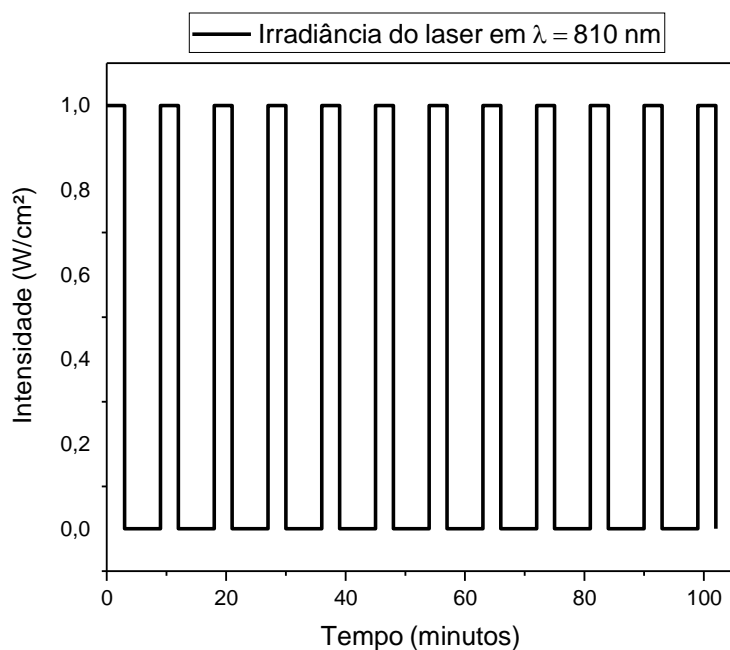


Figura 52 – Perfil de emissão de radiação do laser durante os experimentos de fotoestabilidade.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os espectros de absorção ópticos foram medidos após a diluição das amostras e imediatamente após cada ciclo de irradiação, totalizando, ao final, 1260 J/cm^2 .

A Figura 53 mostra o aumento e o decaimento de temperatura das amostras irradiadas com os ciclos de iluminação. Inicialmente, todas as amostras produziram uma quantidade similar de calor, chegando a aproximadamente $55 \text{ }^\circ\text{C}$, com um aumento de aproximadamente 30°C de temperatura. Contudo, a ICG em H_2O , a partir do segundo ciclo de iluminação, produziu uma quantidade inferior de calor comparado às outras amostras. No último ciclo de irradiação o aumento de temperatura foi de aproximadamente 4°C . Já a ICG diluída em dH_2O com 0,1% de triton X-100 mostrou a mesma produção de calor até o 2º ciclo de iluminação, com um aumento de até $58 \text{ }^\circ\text{C}$. Porém, no último ciclo, mostrou um aquecimento de aproximadamente 8°C , chegando a aproximadamente 40°C . A NanoICG em H_2O , por outro lado, conseguiu manter a capacidade de produzir temperaturas acima de 55°C por 4 ciclos de irradiação, mostrando, nesse ciclo uma tendência à degradação por mostrar um aumento de temperatura ligeiramente menos intenso que a NanoICG em H_2O com Triton. No último ciclo de irradiação, a NanoICG diluída em H_2O produziu um aumento de aproximadamente 18°C de temperatura chegando a aproximadamente 51°C . Por fim, a NanoICG diluída em H_2O com triton mostrou uma estabilidade de produção de calor durante todos os ciclos testados. No

último ciclo de irradiação, a NanoICG aqueceu em torno de 26°C, chegando a aproximadamente 59°C de temperatura máxima, mostrando melhor fotoestabilidade quando comparada a ICG nos dois solventes.

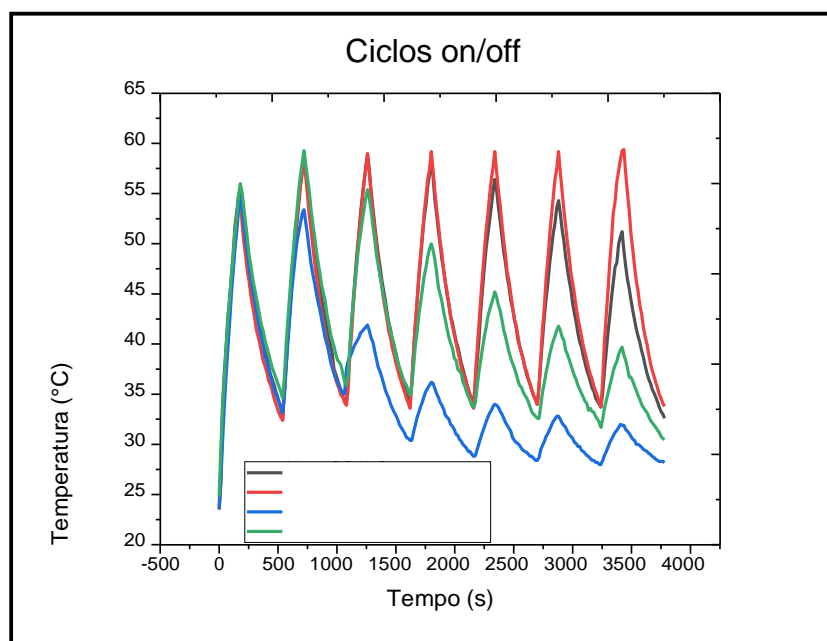


Figura 53 - Fotoestabilidade da ICG e NanoICG 39 $\mu\text{g/mL}$ em diferentes solventes após 7 ciclos de 180 s do laser ligado em 1 W/cm^2 , 810 nm e 360 s desligado.

Fonte: Elaborada pelo autor

Experimentos na literatura com nanopartículas conjugadas com ICG e nanocompósitos mostraram fotoestabilidade durante 5 ciclos On/Off de irradiação em 808 nm e 1 W/cm^2 ao contrário da ICG, que mostrou a mesma eficiência de produção de calor por apenas 1 ciclo. (39) Outros estudos mostram melhor fotoestabilidade de nanoagregados-J de ICG em relação aos monômeros livres, sendo a explicação uma menor taxa de fotodegradação devido à proteção aos oxigênios singletos que os agregados fornecem. (46) Cheung *et al.* mostrou também que há melhor fotoestabilidade dos agregados-J de ICG em relação a molécula desagregada quando irradiada em 0,5 W/cm^2 e 808 nm na concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$. (125)

A figura 54 mostra o espectro de absorção óptica das amostras utilizadas no experimento dos ciclos de irradiação antes e depois das iluminações. A Figura 54-a mostra o espectro da ICG e da NanoICG diluídas em H_2O e ambas as amostras sofreram degradação em ordens similares. Entretanto, a NanoICG em H_2O conseguiu produzir mais calor do 2º ao último ciclo, mostrando que há uma fotodegradação mais tardia quando comparada à ICG. A agregação das

moléculas presentes na NanoICG no formato de agregados-J pode causar um efeito de proteção à fotodegradação devido à menor exposição dos dímeros no interior dos agregados aos oxigênios singletos como discutido por Liu *et al.* sobre nanoagregados-J de ICG. (46)

É possível perceber que a ICG e a NanoICG sofreram degradações semelhantes após a absorção de 1260 J/cm². Contudo, a NanoICG produziu uma quantidade maior de calor por um período maior de tempo. Na Figura 54-b, fica evidente a maior fotoestabilidade da nanoemulsão em H₂O com triton, solvente apto a desfazer os agregados-J. (46) Observa-se, com isso, que em meios em que os agregados-J são menos estáveis, ocorre maior fotoestabilidade da nanoemulsão. Outros fatores podem estar relacionados na fotodegradação da NanoICG, como menor produção de oxigênio singletos pela dICG livre.

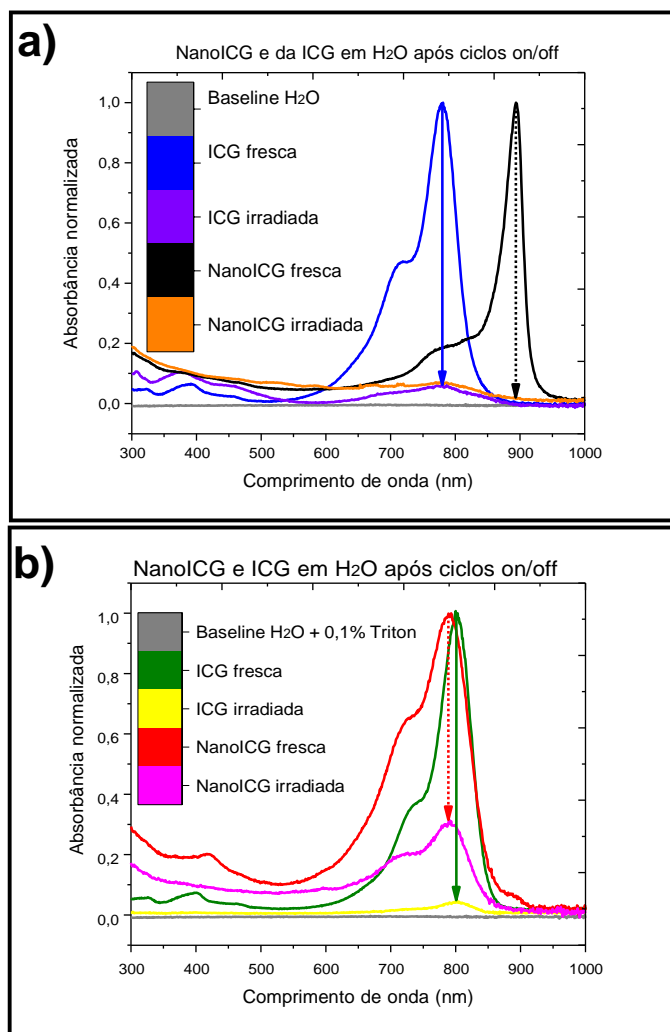


Figura 54 - Em a) espectro de absorção da NanoICG e da ICG em 39 µg/mL em H₂O antes e após os ciclos ligado e desligado de irradiação. Em b) espectro de absorção da NanoICG e da ICG em 39 µg/mL em H₂O com triton antes e após os ciclos ligado e desligado de irradiação.

Fonte: Elaborada pelo autor

Apesar da dICG ter apresentado uma capacidade fototérmica similar à ICG (Figura 51) é possível observar na Figura 53 uma maior fotoestabilidade da amostra dimérica. Ademais, a Figura 54 mostra que a dICG em sua forma desagregada possui um consumo mais lento de sua banda de moléculas livres em relação à ICG após a entrega de 1260 J/cm^2 . No intuito de prever a correlação entre a perda da absorbância da molécula por fotodegradação e a diminuição de seu potencial de formação de calor, foi feita uma análise teórica da fotodegradação das amostras.

4.9.3 Cálculos de fotodegradação

Os dados da Figura 55 foram extraídos da Figura 53, e descrevem o comportamento de fotoestabilidade da NanoICG e ICG apenas diluídas em H_2O com Triton. O experimento descrito mostra que há um aumento da temperatura em torno de 30°C para os primeiros ciclos de irradiação, tanto para NanoICG quanto para a ICG, quando o laser está ligado. Contudo após o segundo ciclo de irradiação, há uma queda constante na geração fototérmica de calor pela ICG.

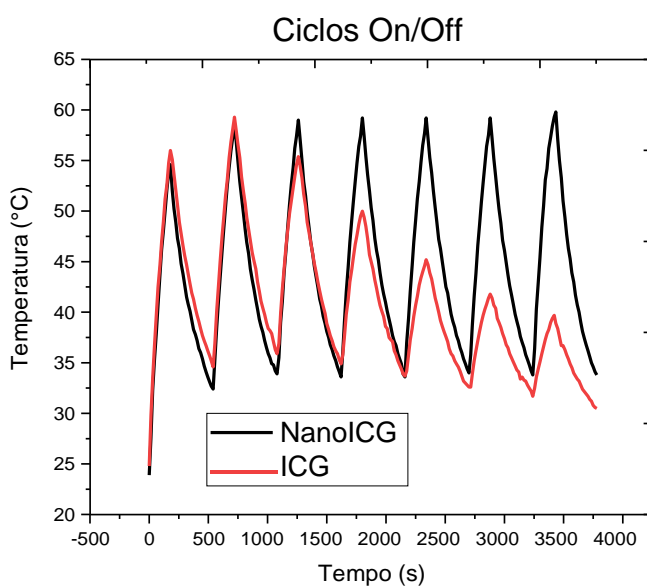


Figura 55 - Fotoestabilidade da ICG e NanoICG $39 \mu\text{g/mL}$ em H_2O com 0,1% triton após 7 ciclos de 180 s do laser ligado em 1 W/cm^2 , 810 nm e 360 s desligado.

Fonte: Elaborada pelo autor

Para compreender de maneira matemática o resultado da faixa de aumento de temperatura de cada ciclo, foi construído um modelo que considera a entrega e conversão da

energia, considerando a intensidade da luz I_0 incidindo sobre uma porção de área A do sistema e que o comprimento total do caminho óptico onde está o meio é de l . Com a propagação do laser pela amostra, ocorre uma atenuação da intensidade I_0 para I . Um esquema está mostrado na Figura 56. Isto significa que, ao entrar no meio, a quantidade de energia carregada por um intervalo de Δt é:

$$I_0 A \Delta t \quad (5)$$

Equivalentemente, a quantidade carregada pelo feixe emergente em ΔT é:

$$I A \Delta t \quad (6)$$

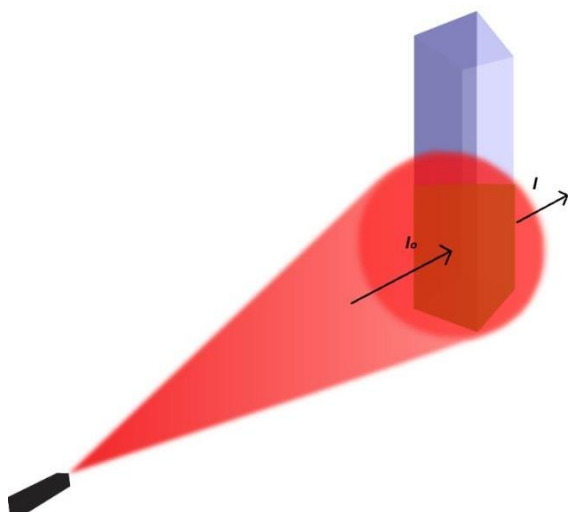


Figura 56 - Fração de luz entregue (I) e transpassada pela amostra (I_0) após irradiação com laser em 810 nm e 1 W/cm².

Fonte: Elaborada pelo autor

Neste intervalo de tempo, a quantidade de energia depositada no meio, ε , é a diferença destes valores

$$\varepsilon = I_0 A \Delta t - I A \Delta t \quad (7)$$

Considerando-se a transformação da luz em calor como reação predominante na amostra, outras reações possíveis entre a luz e a solução são descartadas.

Além disso, considerou-se que há uma densidade de centros opticamente ativos (COA) denominados por n ($\frac{\text{Número de COA}}{\text{Volume}}$) e que o meio que os contém possui uma densidade ρ ($\frac{\text{Massa}}{\text{Volume}}$) e um calor específico c . A massa que será aquecida é, portanto $\Delta m = \rho Al$.

Considerando que toda energia retirada da luz se converte em calor, temos:

$$(I_o - I)A\Delta t = \text{calor} = mc\Delta T = \rho Alc\Delta T \quad (8)$$

onde Δt é o tempo de iluminação e ΔT é a variação de temperatura.

Ocorre, no entanto, que a absorção da energia da luz obedece a lei de Beer-Lambert (decaimento exponencial da luz ao percorrer o meio) que considera apenas a absorção.

Desta forma:

$$I = I_o e^{-\alpha l} \quad (9)$$

onde α é o coeficiente de absorção pelos centros opticamente ativos. Como a densidade destes centros é n e $\sigma(\nu)$ é dado pela seção de choque de absorção para cada centro, temos que:

$$\alpha = \sigma(\nu)n \quad (10)$$

Levando em conta este fato:

$$I_o(1 - e^{-\alpha l})A\Delta t = \rho Alc\Delta T \quad (11)$$

$$I_o(1 - e^{-\alpha l})\Delta t = \rho lc\Delta T \quad (12)$$

$$\Delta T = \frac{I_o(1 - e^{-\sigma n l})\Delta t}{\rho lc} \quad (13)$$

Se não houver variações temporais da densidade de COA n , cada vez que iluminamos por um período Δt , ocorre um aumento final de temperatura ΔT . Caso tenhamos variação temporal da densidade n , por exemplo, com a fotodegradação, então, após cada Δt , a variação da temperatura passa a ser:

$$\Delta T(t) = \frac{I_o \Delta t}{\rho lc} (e^{-\sigma n(t)l}) \quad (14)$$

Ao realizar a análise dos resultados do experimento, foi considerado Δt o período ligado e Δt_d o período desligado. Durante Δt , há aquecimento da amostra e, possivelmente, degradação e, durante Δt_d , há um decaimento da temperatura do sistema. Se não há degradação,

é observado um padrão do aumento da temperatura em relação ao tempo, mostrado na Figura 57.

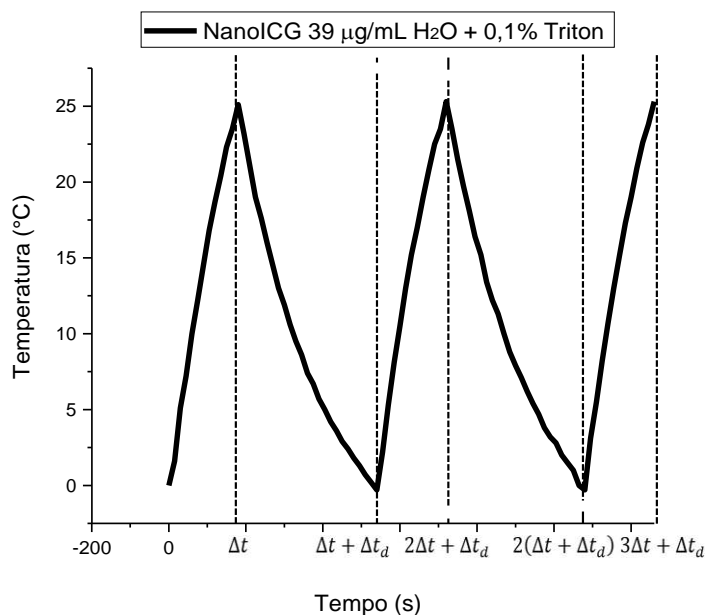


Figura 57 - Estabilidade da quantidade de calor produzida em diferentes ciclos de uma molécula fotoestável.

Fonte: Elaborada pelo autor

Portanto, não havendo degradação suficiente da amostra para que houvesse uma diminuição no número de moléculas ativadas com cada iluminação, mostrando que o sistema alcança uma região de equilíbrio em que a cada ciclo há uma mesma diminuição de temperatura devido à perda de calor para o ambiente quando o laser está desligado e um mesmo aumento de temperatura causado pelas moléculas em solução quando irradiadas, o pico da temperatura e a temperatura máxima permanecem praticamente inalterados. Se, por outro lado, houver degradação, $n(t)$ diminui com o tempo de iluminação, como mostra a Figura 58.

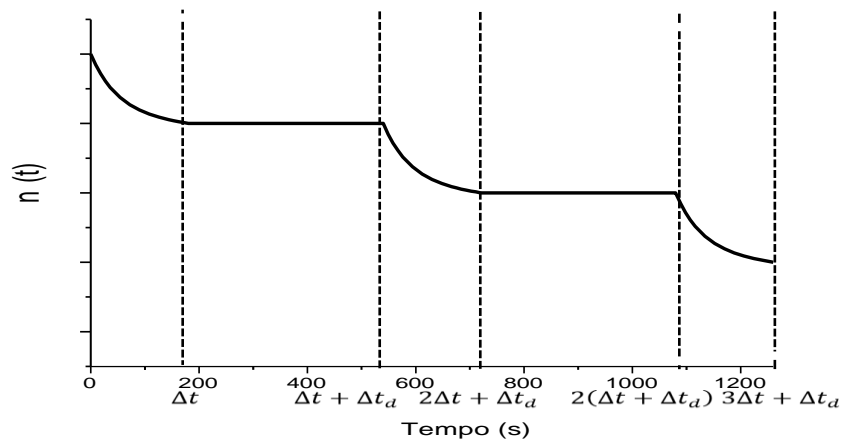


Figura 58 - Diminuição do número de moléculas fotoativas com o tempo devido à fotodegradação dos ciclos On/Off.

Fonte: Elaborada pelo autor

Desta forma, o termo $\sigma n(t)\rho$ será cada vez menor. Quando esse termo diminui, $(1 - e^{-\sigma n l})$ também diminui e, portanto, ΔT diminui. Além disso, no limite quando $n \rightarrow 0$, ΔT também tende a zero. Desta forma, havendo degradação, o padrão de variação de temperatura muda em relação ao tempo, obedecendo um comportamento mostrado na Figura 59.

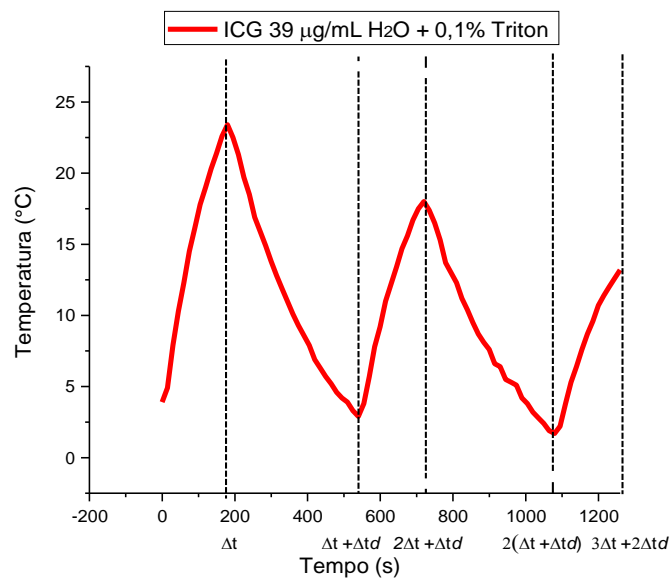


Figura 59 - Perda de eficiência da quantidade de calor produzida em diferentes ciclos de uma molécula com fotoestabilidade limitada.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como, em cada ciclo, há a mesma quantidade de energia entregue porque se repete os mesmos parâmetros de irradiação, a perda de produção de calor (ΔT) por ciclo é dada por:

$$\delta\Delta T \cong \frac{I_0\Delta t}{\rho l c} \sigma d n l \quad (15)$$

Ou seja,

$$\frac{\delta n}{\text{ciclo}} \approx \frac{\delta\Delta T}{\text{ciclo}} \frac{\sigma \rho c}{I_0\Delta t} \quad (16)$$

Isso mostra que, comparando os dados medidos com a análise feita, temos que a formulação NanoICG não degrada rapidamente de forma a perder seu potencial fototérmico quando iluminada, enquanto a formulação convencional de ICG, na forma livre com predominância de monômeros, degrada a cada sucessivo ciclo de irradiação. Fica claro, portanto, que a degradação reduz o efeito fototérmico da molécula de ICG, enquanto a nanoformulação preserva essa propriedade de produção de calor através da iluminação com o passar dos ciclos.

Analisando os primeiros ciclos, vemos que, em termos de eficiência fototérmica, tanto a ICG quanto a NanoICG possuem uma eficiência inicial semelhantes. No entanto, devido à degradação, possivelmente atribuída pela interação com a luz, a molécula vai sucessivamente diminuindo sua eficiência, considerando a proporcionalidade entre $\delta\Delta T$ e δn por ciclo. Essa comparação fica clara quando há a comparação entre as temperaturas máximas atingidas a cada ciclo para a ICG e a NanoICG, mostradas na Figura 60.

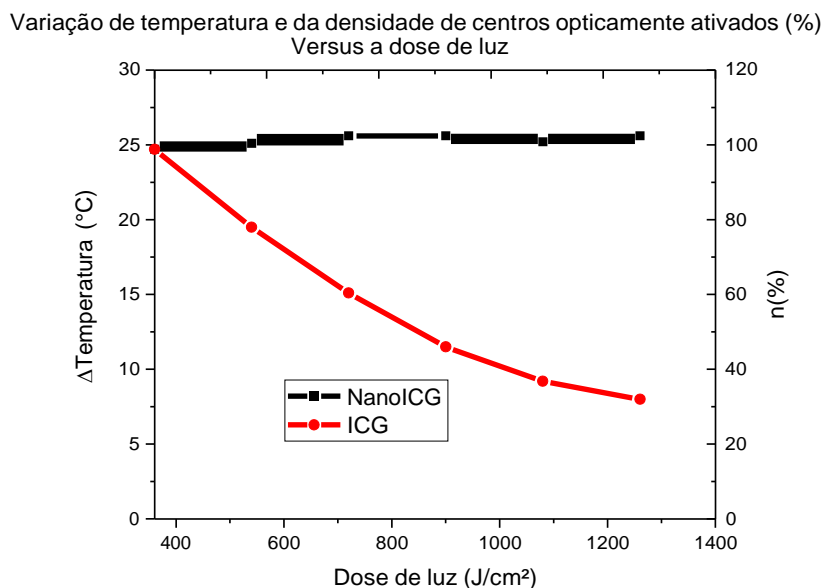


Figura 60 - Comparação da temperatura máxima produzida a cada ciclo On/Off da NanoICG e da ICG, após o segundo ciclo e comparação entre a porcentagem de centros opticamente ativados a cada irradiação em relação ao segundo ciclo.

Fonte: Elaborada pelo autor

Um dos motivos da menor taxa de degradação da NanoICG, pode ser pela possível menor capacidade da molécula em produzir 1O_2 e assim degradar a cianina. (120)

Apesar de haver a correlação entre a perda de absorbância da amostra e sua capacidade fototérmica, ela não ocorre de forma linear. Maziukiewicz *et al.* (2019) mostra que para concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$ da ICG, o aumento da produção de temperatura com a sua iluminação é pouco significativo. (124) A Figura 54-b mostra que a NanoICG após os 7 ciclos de irradiação possuía em torno de 30% de sua absorbância inicial, contudo, sua produção de calor se manteve estável durante todo o experimento. Já para a ICG, houve degradação próxima a 100% de sua absorbância após o experimento, com uma queda na sua eficiência de produção de calor com o passar das iluminações. Isso indica que para ocorrer uma variação do número de centros opticamente ativados e portanto uma variação na produção de calor da NanoICG, é necessário que haja um decaimento de mais de 70% da absorbância inicial da amostra diluída em 156 $\mu\text{g/mL}$.

Levando-se em conta que a NanoICG possui, assim como a ICG, a habilidade fototérmica de produção de calor e ainda possui maior fotoestabilidade e estabilidade em diferentes solventes, testes em *phantoms* de albumina foram feitos para analisar a capacidade da nanoemulsão em produzir calor em meios diferentes de soluções aquosas.

4.10 Phantoms térmicos

Com o intuito de testar o efeito fototérmico da NanoICG em comparação com a dICG e a ICG em um meio que simulasse o tecido biológico, foram feitos experimentos em *phantoms* de albumina, utilizados para a simulação de tumores. (125-126) Foram utilizadas a ICG, dICG e NanoICG nas concentrações de 39 $\mu\text{g/mL}$ e 156 $\mu\text{g/mL}$. O laser utilizado entregou uma irradiância de 0,5 W/cm^2 ou 1 W/cm^2 em 810 nm na superfície dos *phantoms*.

4.10.1 Testes em *phantoms* irradiados em 0,5 W/cm^2 e 810 nm

A Figura 61 mostra os aumentos de temperatura captados pela agulha térmica inserida nos *phantoms*. O grupo controle (sem moléculas fotoativas), ao ser irradiado com 0,5 W/cm^2 , aumentou sua temperatura em torno de até 3 $^{\circ}\text{C}$ com a dose de luz de 300 J/cm^2 . O mesmo aumento de temperatura ocorreu com o *phantom* da ICG na concentração de 39 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que não houve produção de calor relacionada à ICG. Já a dICG (39 $\mu\text{g/mL}$) e a NanoICG (39 $\mu\text{g/mL}$), mostram um aumento de 11 $^{\circ}\text{C}$ e 9 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. Apesar da diferença do aumento de temperatura, as barras de erro entre as duas curvas de temperatura mostram que não há diferença significativa entre as duas amostras quanto a produção de calor. Além disso, após os *phantoms* da NanoICG e da dICG atingirem seu pico de temperatura, houve uma queda na produção de calor durante o período de irradiação, que pode estar associada à fotodegradação da molécula utilizada. (50)

Nas concentrações mais altas das amostras, de 156 $\mu\text{g/mL}$, todos os agentes fototérmicos testados produziram calor acima da temperatura do controle. A Figura 61 mostra que o *phantom* de ICG mostrou 9 $^{\circ}\text{C}$ de variação de temperatura, o da dICG variou em torno de 17 $^{\circ}\text{C}$ e da NanoICG variou em torno de 22 $^{\circ}\text{C}$, sendo que as duas últimas amostras não apresentaram diferença significativa entre si.

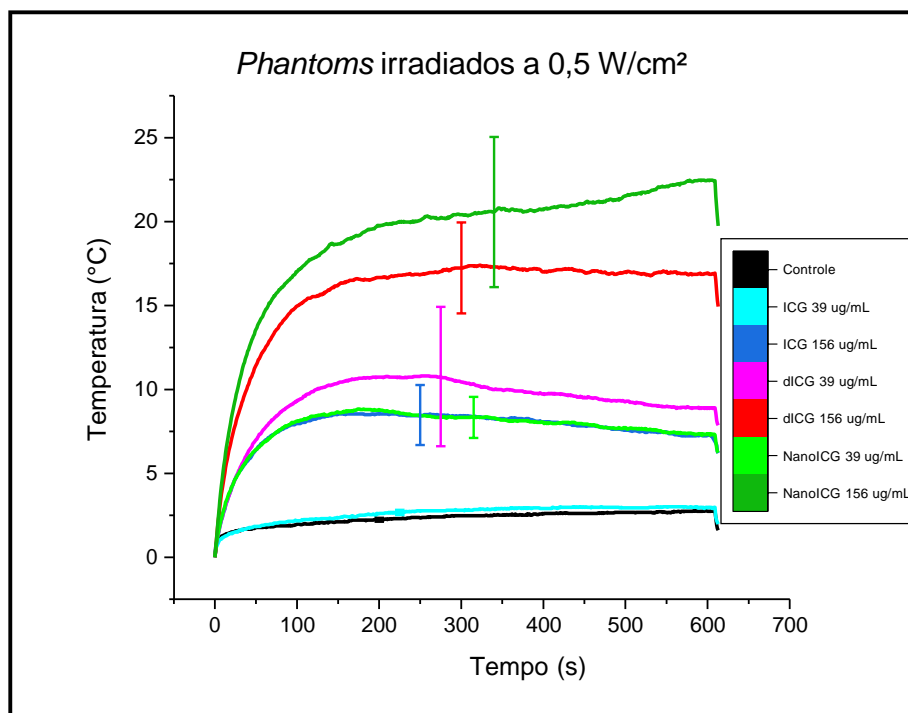


Figura 61 - Variação de temperatura de *phantoms* irradiado com $0,5 \text{ W/cm}^2$ por 10 minutos.

Fonte: Elaborada pelo autor

Como a NanoICG e a ICG produziram quantidades similares de calor, em solução aquosa, pode ter ocorrido a degradação da ICG durante o processo de polimerização dos *phantoms*, que mostra sua desvantagem em meios mais complexos, já que a sua degradação pode ser atribuída a sua estabilidade reduzida em diversos solventes. (43,49) Além disso, a produção de calor pelas amostras pode ter sido influenciada pela mudança da cor dos *phantoms* em relação ao controle, principalmente na concentração de $156 \mu\text{g/mL}$, aumentando a absorção de luz pelos *phantoms*. (128) Uma outra diferença entre as amostras está na interação com proteínas, em que a ICG possui uma afinidade por albumina aproximadamente 11 vezes maior que a dICG (51).

No contexto apresentado, a comparação entre as 3 formas da ICG mostra uma maior dificuldade na produção de calor do monômero ao ser irradiada. Tanto o dímero quanto a NanoICG mostraram uma melhor capacidade fototérmica em uma composição mais complexa que a solução aquosa. Além disso, a NanoICG, mostrou-se o derivado de ICG mais apto a fototermia no contexto apresentado.

As imagens termográficas das amostras na concentração de $156 \mu\text{g/mL}$ dos *phantoms* irradiados a $0,5 \text{ W/cm}^2$ estão apresentadas na Figura 62 nos períodos 0, 300, 400, 500 e 600 segundos após o início das irradiações. As temperaturas máximas atingidas nos *phantoms* foram de $25,2 \text{ }^\circ\text{C}$ para o controle, $29,9 \text{ }^\circ\text{C}$ para a ICG, $45 \text{ }^\circ\text{C}$ para a dICG e $49,2 \text{ }^\circ\text{C}$ para a NanoICG.

Como o necessário para se atingir morte celular em tumores é alcançar uma hipertermia de pelo menos 43°C, onde começa a acontecer apoptose, o aumento de temperatura produzido pela dICG e NanoICG nos parâmetros mostrados são de interesse para o uso *in vivo*. (28) Além disso para ocorrer a morte celular outros fatores são levados em conta como o tempo de aquecimento da célula alvo, definido pela dose térmica e sua linhagem celular. (129,130)

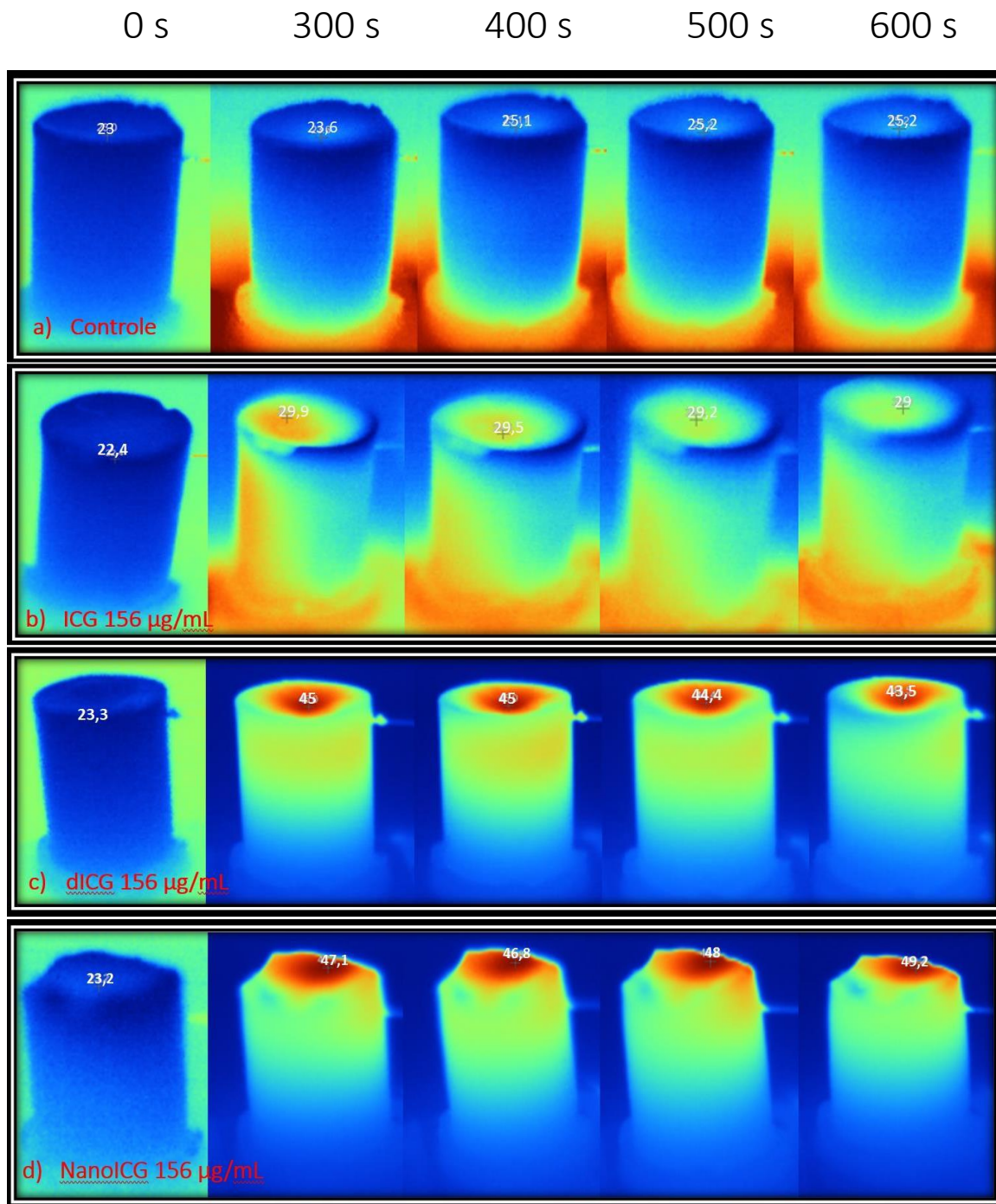


Figura 62 - Amostras com diferentes tempos de irradiação a $0,5 \text{ W/cm}^2$, sendo em a) o controle, b) ICG $156 \mu\text{g/mL}$, c) dICG $156 \mu\text{g/mL}$ e d) NanoICG $156 \mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pelo autor

Os testes em *phantoms* de albumina também foram realizados com uma irradiância mais alta, em 1 W/cm^2 , para compreender melhor o potencial de geração fototérmica das amostras nesse contexto.

4.10.2 Testes em *phantoms* irradiados em 1 W/cm^2 e 810 nm

A Figura 63 mostra os aumentos de temperatura dos *phantoms* quando irradiados com iluminação em 1 W/cm^2 e 810 nm . O controle aumentou sua temperatura em torno de $5 \text{ }^\circ\text{C}$, que, comparado a irradiação em $0,5 \text{ W/cm}^2$, mostrou um ganho de 2°C . A ICG, na concentração de $39 \text{ } \mu\text{g/mL}$, não mostrou diferença do aumento de temperatura em relação ao controle. A dICG ($39 \text{ } \mu\text{g/mL}$) e a NanoICG ($39 \text{ } \mu\text{g/mL}$) nas mesmas concentrações apresentaram aumentos de temperatura de, aproximadamente, 14°C e 17°C , respectivamente.

Nas concentrações mais altas das amostras, de $156 \text{ } \mu\text{g/mL}$, a ICG mostrou um aumento de temperatura em torno de $16 \text{ }^\circ\text{C}$, a dICG de 33°C e a NanoICG de 71°C .

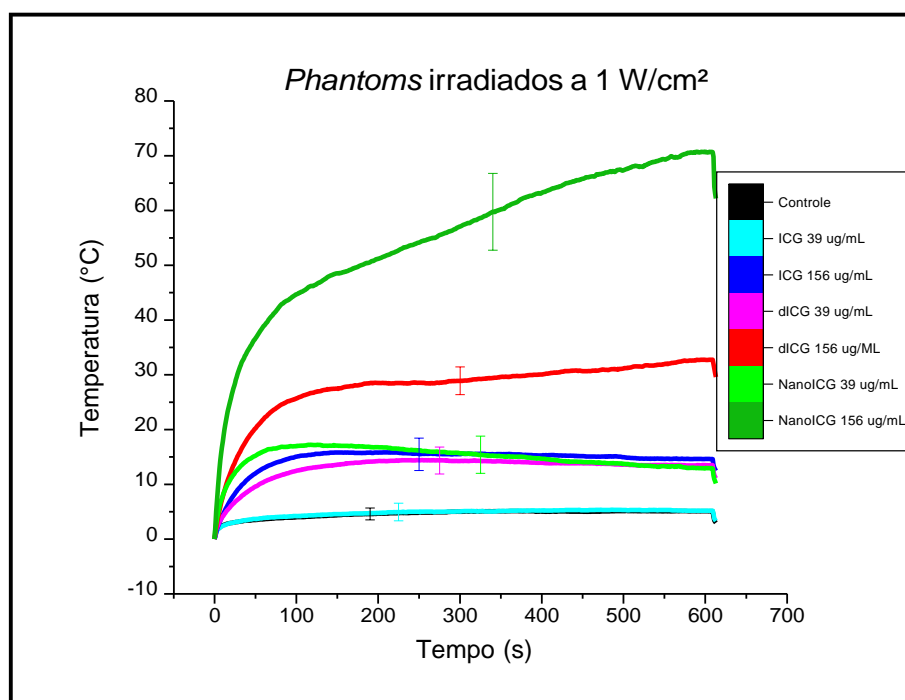


Figura 63 - Variação de temperatura de *phantoms* irradiado com 1 W/cm^2 por 10 minutos.

Fonte: Elaborada pelo autor

As imagens termográficas das amostras na concentração de $156 \text{ } \mu\text{g/mL}$ dos *phantoms* irradiados a 1 W/cm^2 são mostradas na Figura 64. As temperaturas máximas atingidas nos *phantoms* foram de $25,2 \text{ }^\circ\text{C}$ para o controle (Figura 64-a), $37,8 \text{ }^\circ\text{C}$ para a ICG (Figura 64-b), $64,3^\circ\text{C}$ para a dICG (Figura 64-c) e $128,2^\circ\text{C}$ para a NanoICG (Figura 64-d). A imagem térmica mostra como foi o padrão de produção de calor, apresentando um aumento de temperatura localizado ao foco de irradiação.

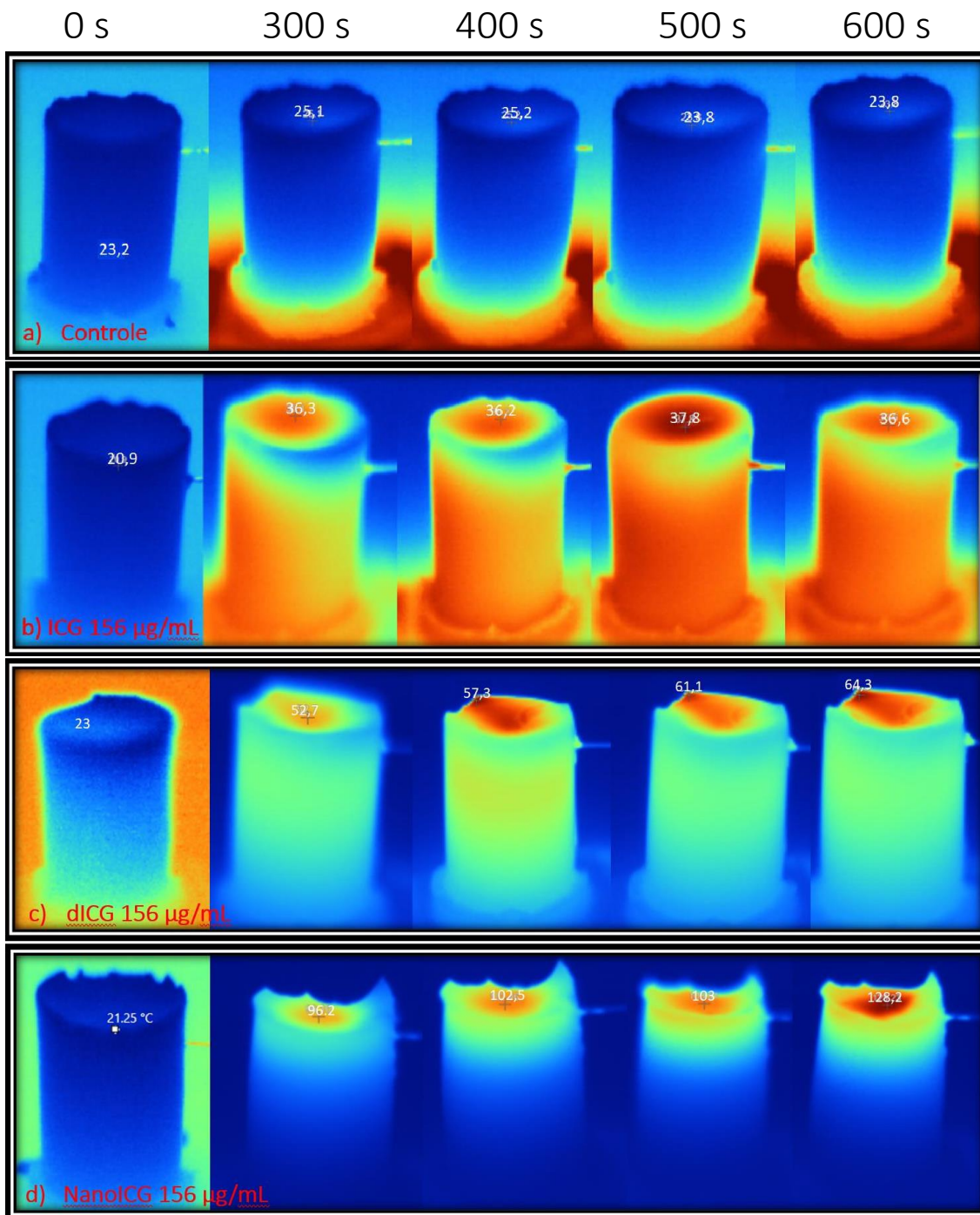


Figura 64 - Controle 1W/cm², ICG 156 µg/mL 1W/cm², dICG 156 µg/mL 1 W/cm², NanoICG 156 µg/mL 1 W/cm².

Fonte: Elaborada pelo autor

O aumento de temperatura encontrado das nanoemulsões em um *phantom* que simulasse os tecidos biológicos foi o mais eficiente na produção de calor, com temperaturas suficientes para causar a morte celular. (29) Já a ICG, apesar de possuir capacidade similar de produção de calor em solução aquosa, apresentou baixa produção de calor num ambiente mais parecido com o tecido biológico, mostrando baixa eficiência para a PTT em comparação as outras amostras. O

phantom utilizado é feito de albumina, molécula em que a ICG se adsorve e minimiza suas propriedades de agregação e degradação. (44) Contudo, no experimento, a cianina não conseguiu manter suas propriedades fototérmicas de forma eficiente.

Houve resultados díspares entre a ICG e a NanoICG quanto a fototermia em *phantoms* comparado aos dados apresentados em dispersão aquosa. Fatores que diferenciam o uso da NanoICG, da ICG recentemente preparada, como a dimerização da molécula, as diferentes propriedades de estabilidade em solventes apresentadas, suas propriedades de agregação, podem ser o motivo dos resultados obtidos. Com isso, levando-se em conta que ambas as moléculas são AFs, e que a NanoICG se mostrou especialmente eficiente na fototermia em *phantoms*, foram realizados experimentos relacionados a comparação da NanoICG e da ICG em ambiente tumoral.

4.11 Estudos em modelo de melanoma cutâneo murino

Para testar a eficiência da terapia fototérmica *in vivo* utilizando as nanoemulsões de ICG, assim como para compará-las em seu efeito com a ICG e a dICG, foram realizados experimentos em melanoma cutâneo de camundongos. As substâncias foram injetadas de forma intratumoral. A concentração final obtida ao utilizar a dICG e a ICG foram de 156 µg/mL e para a NanoICG foi de 78 µg/mL e 156 µg/mL. A irradiação foi feita em 0,5 W/cm² durante 10 minutos com o animal sedado. O aumento de temperatura no tumor foi medido com uma agulha térmica inserida diretamente no melanoma e com imagens de uma câmera termográfica.

4.11.1 Registros térmicos da PTT

O grupo controle, que não recebeu a injeção intratumoral de nenhuma substância, foi irradiado por 10 minutos, mostrando uma variação de temperatura de até 17°C. Essa variação ocorre pois a própria melanina presente no tumor é capaz de converter luz no IVP em calor. (131) O grupo controle, que recebeu uma injeção de PBS intratumoral e foi irradiado por 10 minutos, mostrou um aumento de temperatura de até 12°C. Após a injeção do PBS, a coloração do tumor se tornou mais clara, podendo ter dificultado o acesso da luz à melanina, levando a essa menor produção de calor. O grupo que recebeu dICG na concentração final de 156 µg/mL apresentou aumento de temperatura entre 20°C e 25°C. A NanoICG se mostrou mais eficiente

na produção de calor, com aumentos em torno de 25°C para a concentração de 78 µg/mL e 27°C, na concentração de 156 µg/mL. Finalmente a ICG, na concentração de 156 µg/mL, foi tão eficiente quanto a NanoICG na produção de calor. Todos esses valores e os dados obtidos ao longo do tempo estão mostrados na Figura 65.

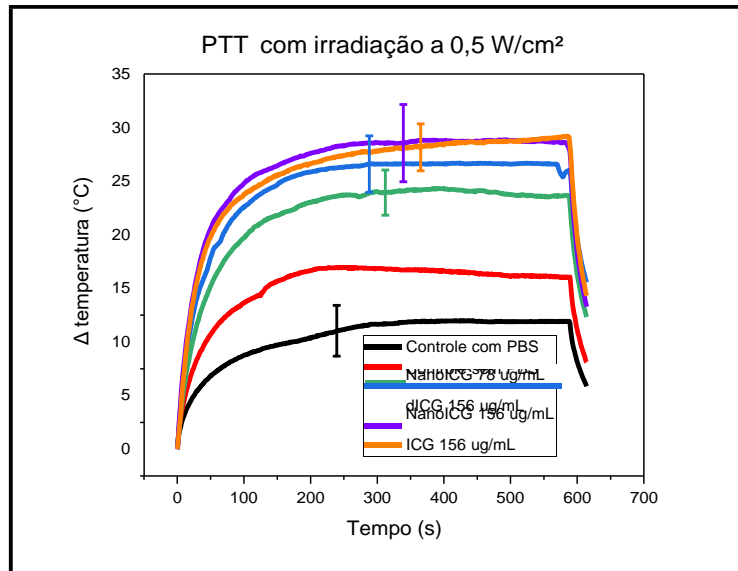


Figura 65 - Variação de temperatura de melanomas cutâneos in vivo com iluminação a 810nm e 0,5 W/cm² por 10 minutos.

Fonte: Elaborada pelo autor

As temperaturas alcançadas em cada PTT também foram analisadas através de imagens termográficas. Essas imagens são importantes para observar se os aumentos de temperatura ocorrem de forma homogênea e restrita à área tumoral. (29) A Figura 66 mostra a temperatura atingida após os 600 segundos de irradiação dos grupos de tratamento dos melanomas. Os controles sem injeção alguma e com injeção de PBS mostraram um aumento de temperatura similar, alcançando uma temperatura superficial de aproximadamente 50 °C (Figura 66-a e Figura 66-b) devido às propriedades intrínsecas de conversão da luz IVP em calor da melanina. (131) A dICG (156 µg/mL) alcançou temperaturas de até 63°C (Figura 66-c), e a NanoICG, em ambas as concentrações utilizadas, 78 µg/mL e 156 µg/mL, apresentou temperatura superficial máxima de 69 °C e 79 °C, respectivamente (Figura 66-d e Figura 66-e) e, portanto, foram mais eficientes. Características como temperatura, pH e concentração de sais de um meio influenciam na estabilidade e propriedades físicas das nanoemulsões (132), e, com isso, podem melhorar a eficiência da PTT *in vivo* da NanoICG em relação à dICG. Finalmente, o uso da ICG na PTT proporcionou o maior aumento de temperatura local (Figura 66-f), de aproximadamente 93°C. Apesar da ICG não se mostrar eficiente na produção fototérmica em

phantoms, ela se mostrou capaz de produzir calor com a administração intratumoral *in vivo* em melanoma cutâneo, mostrando que quando utilizada logo após sua diluição, a ICG se mantém eficaz.

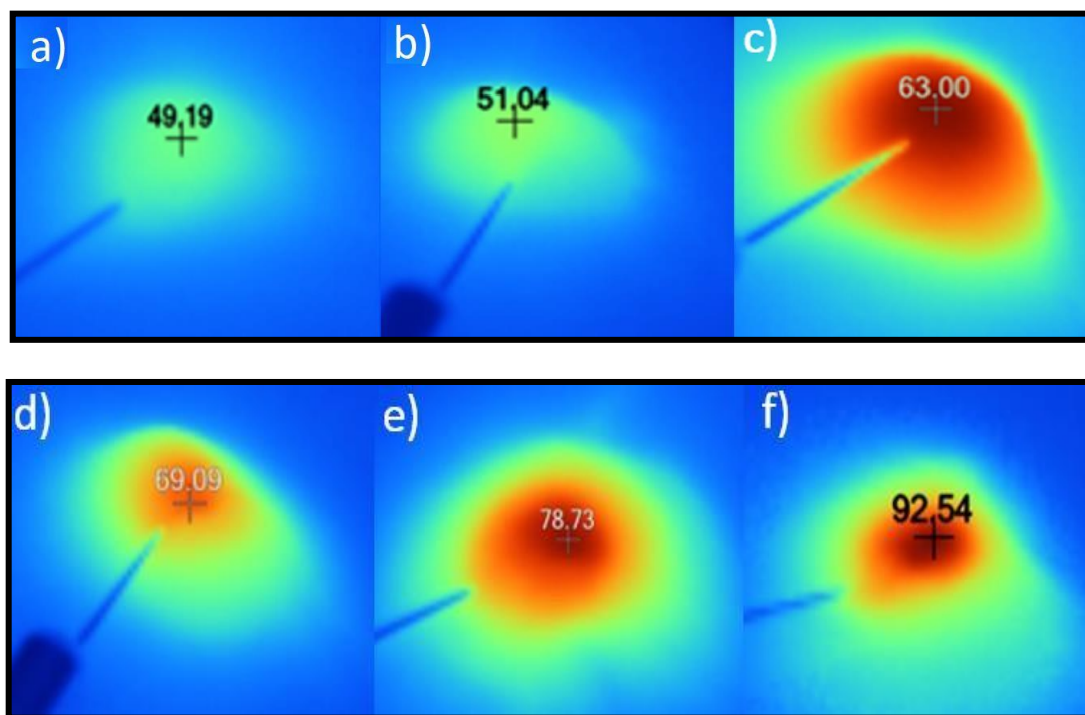


Figura 66 - Imagens termográficas de melanoma cutâneo após irradiação de 600 J/cm^2 em 810 nm em a) após a injeção intratumoral de PBS, em b) sem nenhuma substância em c) com dICG na concentração final de $156 \mu\text{g/mL}$, em d) com a NanoICG na concentração final de $78 \mu\text{g/mL}$, em e) com a NanoICG na concentração final de $156 \mu\text{g/mL}$ e em f) com ICG na concentração final de $156 \mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada pelo autor

As temperaturas máximas que foram alcançadas em certas células tumorais com a PTT ultrapassaram 60°C , mostrando temperaturas máximas mais elevada do que outros tratamentos bem sucedidos de PTT. (32,125) Contudo, é necessário que haja uma entrega suficiente de dose térmica em todas as células tumorais, mesmo nas mais profundas, para que sofram a morte celular, sem que ocorra um dano significativo no tecido saudável. (129,133)

Apesar das diferenças encontradas da NanoICG e da ICG quanto a produção de calor na PTT registrada pela câmera termográfica, Figura 66, não houve diferença significativa nos resultados mostrados pela agulha térmica. Isso pode ter ocorrido porque a agulha térmica está inserida dentro do tumor, assim sendo, ela afere a medida de temperatura em um ponto específico e interno do tumor. Já a câmera termográfica mostra a temperatura máxima captada

pela câmera, independentemente da profundidade em que ele ocorre. Com isso, há um indício que a NanoICG mostrou maior consistência que a ICG na produção de calor no tumor.

Para se verificar a efetividade do tratamento intratumoral realizado, é importante que não haja indícios de células tumorais remanescentes após a PTT. (133) Sendo assim, foi necessário observar o dano causado pela PTT no melanoma, assim como acompanhar a efetividade até 14 dias após ao tratamento com relação a aparente extinção ou recidiva do mesmo.

4.11.2 Análise dos tumores

Os tumores submetidos à PTT foram acompanhados durante 14 dias. Os animais controles apresentaram tumores com crescimento excessivo e os animais precisaram ser sacrificados antes do período de 14 dias. É possível observar, na Figura 67, que todos os melanomas irradiados obtiveram aspectos semelhantes em cada etapa do processo. As Figuras 65-a, 65-b, 65-c e 65-d mostram respectivamente a PTT com NanoICG a 78 $\mu\text{g/mL}$ e NanoICG, dICG e ICG, todos a 156 $\mu\text{g/mL}$. As imagens foram coletadas: antes do tratamento, após a injeção, após a irradiação e nos dias 3, 7 e 14 após o tratamento.

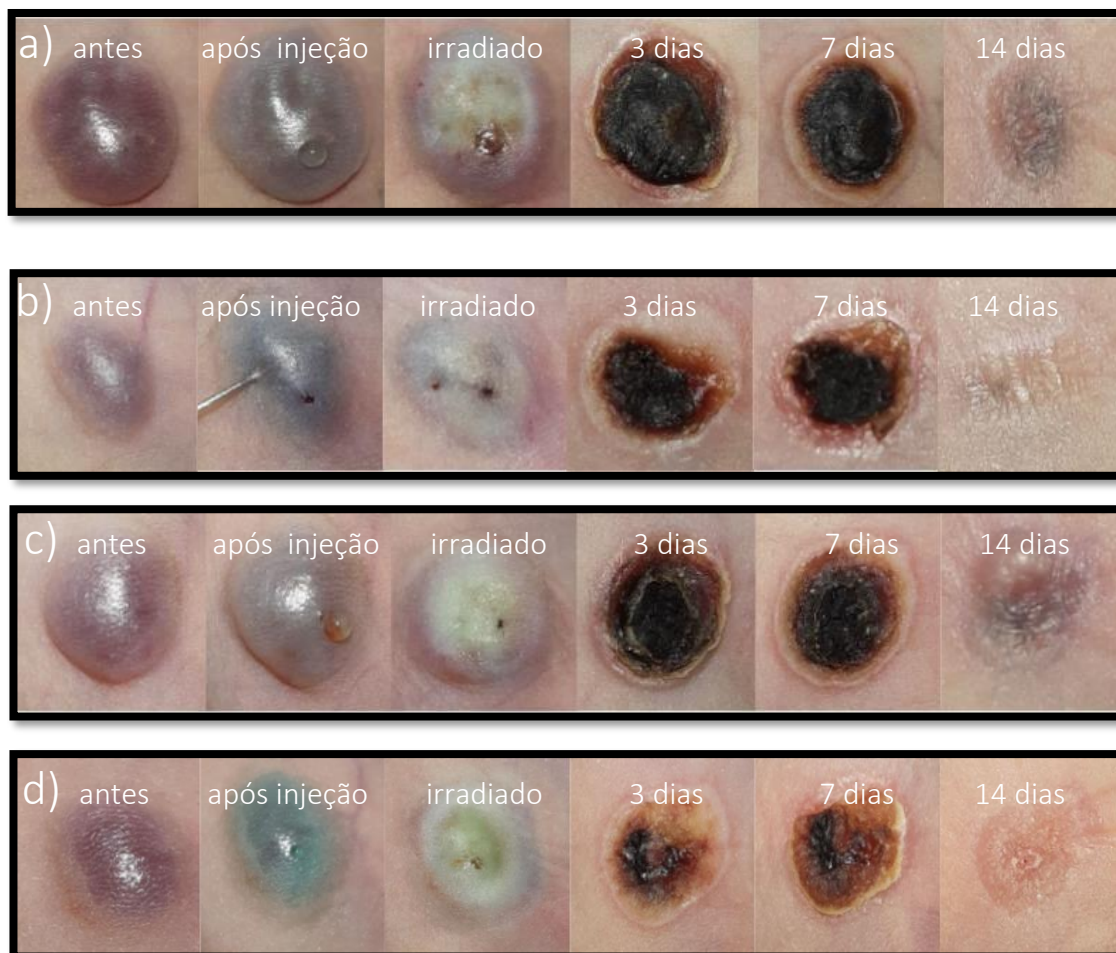


Figura 67 – Imagens da PTT nos períodos antes da injeção intratumoral, após a injeção intratumoral, após a irradiação de 10 minutos, 3 dias após o tratamento, 7 dias após o tratamento e 14 dias após o tratamento. Utilizando para a injeção intratumoral em a) a NanoICG 78g/mL, em b) a NanoICG 156µg/mL, em c) os dímeros 156µg/mL e em d) a ICG 156µg/mL.

Fonte: Elaborada por Letícia Palombo Martinelli

Quando há um tratamento bem sucedido, ocorre uma completa eliminação do volume tumoral com o tempo, (46,122) como é possível observar nas Figura 67-b e 67-d. Contudo, em tratamentos em que não há resposta eficiente ou apenas resposta parcial, o tumor continua a crescer ou apenas mantém seu volume (53,87,134), como mostrado em Figura 68-a e 68-b.

Há exemplos descritos na literatura do uso intratumoral de modificações da ICG para a realização de PTT em melanoma modelo murino bem sucedidos. Hwang e Jin (2020), mostraram que a ICG aliada a modificações como hidrogéis com o alvo de realizar a PTT com $1\text{W}/\text{cm}^2$ e 808 nm. As temperaturas máximas alcançadas foram em torno de 63°C , sendo suficiente para obter resultados de completa eliminação tumoral em melanoma de camundongos. (86)

Conforme mostra a Tabela 5, A PTT realizada com NanoICG a 156 $\mu\text{g/mL}$ obteve resultados positivos na recidiva tumoral para 66% dos casos em um período de 14 dias após o tratamento, momento em que foi realizada a dissecação da região tumoral. O grupo da ICG mostrou resultados positivos na recidiva tumoral em 100% dos casos. A dissecação não apresentou indícios visíveis de células tumorais nos casos de resultados positivos. Apesar do grupo da ICG não mostrar recidiva tumoral nesse período, os tumores usados nesse grupo possuíam uma amostragem menor do que os utilizados para o grupo da NanoICG, podendo ocasionar diferenças nos resultados, principalmente porque a variação do volume tumoral testados com a ICG foi entre 57,4 mm^3 e 60,5 mm^3 e da NanoICG entre 30,8 mm^3 e 153 mm^3 , sendo mais difíceis os tratamentos com tumores de volume maior.

Tabela 5 – Recidiva tumoral após PTT

Amostra	N° de animais	Recidiva tumoral
ICG 156 $\mu\text{g/mL}$	2	0%
NanoICG 156 $\mu\text{g/mL}$	6	33%
NanoICG 78 $\mu\text{g/mL}$	3	100%
dICG 156 $\mu\text{g/mL}$	3	100%

Já no caso dos tratamentos com a NanoICG em 78 $\mu\text{g/mL}$ e com a dICG em 156 $\mu\text{g/mL}$ houve indícios da existência de células de melanoma com a dissecação da região tumoral 14 dias após ao tratamento, Figura 68, feita como descrito na seção 3.13 da metodologia. Os indícios de células tumorais podem ser vistos como a região redonda e escura, nas Figuras 66-a e 66-b, no centro da amostra retirada dos animais.

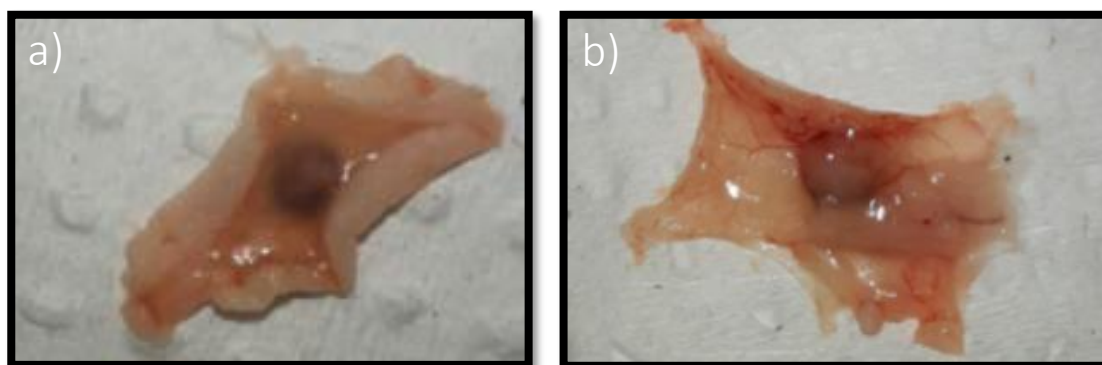


Figura 68 - Recidiva de tumores após 14 dias da PTT com NanoICG 78 $\mu\text{g/mL}$ e dICG 156 $\mu\text{g/mL}$.

Fonte: Elaborada por Letícia Palombo Martinelli

Diante da eficiência em relação ao uso *in vivo* e intratumoral para a PTT da NanoICG assim como da ICG, ambas na concentração de 156 µg/ml, conclui-se a eficiência do uso tanto da molécula livre quanto de sua nanoformulação. Apesar da ICG também ser uma candidata à PTT *in vivo*, a molécula é rapidamente excretada por via hepática quando injetada na circulação sanguínea humana devido sua afinidade por proteínas como a albumina (41-42), além de possuir baixa estabilidade em soluções aquosas. (49) Já a NanoICG apresenta vantagens quanto sua maior estabilidade em diferentes solventes, sua diferente forma de interação com proteínas plasmáticas, sua possibilidade de estoque por 3 meses em soluções aquosas além da sua capacidade de ser dopada com outras substâncias em seu interior. Além disso, os dados que a dICG mostra na dissertação e na literatura corroboram com a conclusão de que a NanoICG mostra indicativos positivos em relação à ICG para o uso em circulação sanguínea através da administração intravenosa ou intraperitoneal devido a uma menor afinidade a proteínas como a albumina, que leva à excreção da molécula, e menor degradação de suas propriedades fototérmicas quando em períodos acima de 15 horas em phantoms de albumina. É interessante que um AF possa ser entregue pelas formas intravenosa e intraperitoneal pois a forma intratumoral apresenta riscos de espalhamento tumoral, além de dificuldades no tratamento de tumores profundos e metastáticos. (32)

5 CONCLUSÃO

A NanoICG foi comparada com a forma monomérica e com a forma dimérica da ICG. Por ser uma nanoemulsão ainda não reportada, testes de caracterização foram necessários para o entendimento das propriedades dessa nanoformulação. Primeiramente, em relação à estabilidade, a NanoICG se mostrou homogênea, com índice de polidispersão menor que 0,2 imediatamente após a síntese e com esse valor sendo mantido por, aproximadamente, 6 meses. Apesar disso, houve variação no tamanho da NanoICG nesse período de tempo, de, aproximadamente, 180 nm para 300 nm. Interessantemente, o HPLC mostrou que houve a dimerização da ICG na nanoemulsão em 12 dias, após a sua síntese, e esses dímeros se mantiveram estáveis por pelo menos 3 meses. Outra importante característica da dICG presente na NanoICG foi vista através do seu espectro de absorção óptico, em que sua organização se mostrou na forma de agregados-J. Esses agregados se mostraram mais estáveis em meios com sais, como o PBS e menos estáveis em solventes orgânicos, como o metanol. Para concluir os testes de estabilidade da NanoICG em soluções aquosas, foi observado que, em concentrações de 3,9 µg/mL, a NanoICG e a dICG mostraram espectros de absorção óptico mais estáveis que a ICG em diferentes temperaturas, principalmente a 37°C.

A NanoICG também foi caracterizada quanto suas propriedades de interação com a luz, mostrando vantagens em relação à ICG. A NanoICG, com suas moléculas no estado de agregados-J, sofreu uma fotodegradação mais lenta que a dICG e a ICG diluídas em PBS. Além disso, a NanoICG a 156 µg/mL, quando irradiada em 808 nm e 1 W/cm², produziu uma alteração de temperatura tão grande quanto a ICG 156 µg/mL, de em torno de 50°C. Assim sendo, a dimerização da molécula de ICG preservou suas propriedades fototérmicas, entretanto, a NanoICG apresentou uma fotoestabilidade superior à ICG, tanto na sua forma de agregados-J, quanto na sua forma de dímeros livres. O aumento de temperatura da NanoICG, no 7º ciclo de irradiação, com doses de luz de 180 J/cm² a cada ciclo, foi entre 15°C e 25,6°C enquanto da ICG foi entre 4°C e 8°C, dependendo do solvente utilizado. Isso indica que, apesar da ICG dimerizada nunca ter sido considerada alvo de estudo para a PTT, a molécula possui uma capacidade fototérmica tão eficiente quanto da ICG, porém com maior fotoestabilidade.

Para a realização de testes fototérmicos mais próximos ao ambiente tumoral, foram utilizados *phantoms* de albumina. A NanoICG quando irradiada com 1 W/cm² mostrou um aumento de mais 100°C de temperatura, nos *phantoms*, enquanto a dICG aumentou em torno de 40°C e a ICG mostrou um aumento de em torno de 15°C. Nesse teste foi possível perceber

que a NanoICG pode ser um agente fototérmico mais interessante que a ICG quando exposto em meios biológicos complexos como *phantoms* de albumina por um período acima de 15 horas. Além de manter a estabilidade horas após sua aplicação, esses estudos mostraram a importância da nanoemulsão para a manutenção do potencial fototérmico da dICG.

Além dos experimentos em *phantoms*, foram feitos testes em modelo murino de melanoma cutâneo com a NanoICG, a dICG e a ICG. Os resultados da ICG e da NanoICG a 156 $\mu\text{g/mL}$ mostraram uma aparente eliminação dos tumores após 14 dias da PTT. Assim sendo, a NanoICG mostra potencial como agente fototérmico, com destaque para sua fotoestabilidade. Além disso, ela se mostra especialmente interessante para uma futura aplicação em testes intravenosos e intraperitoneais devido sua estabilidade acentuada em soluções aquosas e menor afinidade a albumina. Ademais, a NanoICG ainda possui a vantagem de possuir apenas óleo em seu interior e conseqüentemente poder ser dopada com outras substâncias para a realização de terapias conjugadas, o que faz dela uma aplicação com perspectivas interessantes para o uso em terapia fototérmica.

REFERÊNCIAS

- 1 CAI, Y. *et al.* Organic dye based nanoparticles for cancer phototheranostics. *Small*, v.14, n. 25, p. 1-17, 2018. DOI: 10.1002/sml.201704247
- 2 WEN, Y.; SCHREIBER, C. L.; SMITH, B. D. Dual-targeted phototherapeutic agents as magic bullets for cancer. *Bioconjugate Chemistry*, v. 31, n. 3, p. 474–482, 2020. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.9b00836
3. UTSCHIG, C.; RÖTTGERS, R. Mass-specific light absorption coefficients of mineral particles in aqueous suspension for the ultraviolet to near-infrared radiation spectral region (200–2500 nm). *Applied Optics*, v. 59, n. 33, p. 10554, 2020. DOI: 10.1364/ao.393289
- 4 MALLIDI, S. *et al.* Beyond the barriers of light penetration: Strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. *Theranostics*, v. 6, n. 13, p. 2458-2487, 2016. DOI: 10.7150/thno.16183
- 5 VAN STRATEN, D. *et al.* Oncologic photodynamic therapy: basic principles, current clinical status and future directions. *Cancers*, v. 9, n. 2, p. 1-54, 2017. DOI: 10.3390/cancers9020019
- 6 SHEN, Y.; WANG, L. V. Focusing light through biological tissue and tissue-mimicking phantoms up to 9 . 6 cm in thickness with digital optical phase conjugation. *Journal of Biomedical Optics*, v. 21, n. 8, p. 085001, 2016. DOI: 10.1117/1.JBO.21.8.085001
- 7 POGUE, B. W.; PATTERSON, M. S. Review of tissue simulating phantoms for optical spectroscopy, imaging and dosimetry. *Journal of Biomedical Optics*, v. 11, n. 4, p. 041102, 2006. DOI: 10.1117/1.2335429
- 8 GOLDFAIN, A. M. *et al.* Polydimethylsiloxane tissue-mimicking phantoms with tunable optical properties. *Journal of Biomedical Optics*, v. 27, n.07, p. 1–13, 2021. DOI: 10.1117/1.jbo.27.7.074706
- 9 ALVAREZ, E. G. *et al.* Atmospheric photosensitized heterogeneous and multiphase reactions: from outdoors to indoors. *Environmental Science and Technology*, v. 46, n. 4, p. 1955-1963, 2012. DOI: 10.1021/es2019675
- 10 FENG, G.; ZHANG, G. Q.; DING, D. Design of superior phototheranostic agents guided by Jablonski diagrams. *Chemical Society Reviews*, v. 49, n. 22, p. 8179-8234, 2020. DOI: 10.1039/d0cs00671h
- 11 WYLIE, D. *Evidence for Dna oxidation in single molecule fluorescence studies*. 2006
Disponível em:
https://etd.ohiolink.edu/apexprod/rws_etd/send_file/send?accession=ohiou1155923690&disposition=inline. Acesso em: 23 jan. 2021.
- 12 NIGGEMANN, B. Ophthalmological Investigations in Toxicity Studies. *In: BLUEMEL, J. et al. (ed.). The nonhuman primate in nonclinical drug development and safety assessment*. Cambridge: Academic Press, 2015. Cap. 28, p. 543-550. DOI: 10.1016/B978-0-12-417144-2.00028-7
- 13 DITHMAR, S.; HOLZ, F.G. *Fluorescence angiography in ophthalmology*. Heidelberg: Springer. 2017.
- 14 KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and

- combinations. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 106, p. 1098–107, 2018. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049. DOI: 10.1016/j.biopha.2018.07.049
- 15 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004. DOI: 10.1016/S1572-1000(05)00007-4.Mechanisms
- 16 ORMOND, A. B.; FREEMAN, H. S. Dye sensitizers for photodynamic therapy. *Materials*, v. 6, n. 3, p. 817-840, 2013. DOI: 10.3390/ma6030817
- 17 KESSEL, D.; OLEINICK, N. L. Cell death pathways associated with photodynamic therapy: an update. *Photochemistry and Photobiology*, v. 94, n. 2, p. 213-218, 2018. DOI: 10.1002/tcr.201600121
- 18 LI, X. *et al.* Clinical development and potential of photothermal and photodynamic therapies for cancer. *Nature Reviews Clinical Oncology*, v. 17, n. 11, p. 657-674, 2020. DOI: 10.1038/s41571-020-0410-2.
- 19 CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic therapy: past, present and future. *Chemical Record*, v. 17, n. 8, p. 775-802, 2017. DOI: 10.1038/s41571-020-0410-2
- 20 CHEN, J. *et al.* Advances in nanomaterials for photodynamic therapy applications: status and challenges. *Biomaterials*, v. 237, n. 10, p. 119827, 2020. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119827
- 21 RAMIREZ, D. P. *et al.* Experience and BCC subtypes as determinants of MAL-PDT response : preliminary results of a national Brazilian project. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 11, n. 1, p. 22–26, 2014. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2013.11.001.
- 22 BUZZA, H. H. *et al.* Overall results for a national program of photodynamic therapy for basal cell carcinoma : a multicenter clinical study to bring new techniques to social health care. *Cancer Control*, v. 26, n. 1, p. 1-12, 2019. DOI: 10.1177/1073274819856885.
- 23 ZHI, D. *et al.* Photothermal therapy. *Journal of Controlled Release*, v. 325, n. 6, p. 52-71, 2020. DOI: 10.1016/j.jconrel.2020.06.032.
- 24 ZHANG, Y. *et al.* Temperature-dependent cell death patterns induced by functionalized gold nanoparticle photothermal therapy in melanoma cells. *Scientific Reports*, v. 8, n. 2, p. 1-9, 2018. DOI:10.1038/s41598-018-26978-1.
- 25 ROTI, J. L. R. Cellular responses to hyperthermia (40–46 ° C): Cell killing and molecular events. *International Journal of Hyperthermia*, v. 24, n. 1, p. 6736, 2009. DOI: 10.1080/02656730701769841
- 26 ESKIIZMIR, G.; BASKIN, Y.; YAPICI, K. Graphene-based nanomaterials in cancer treatment and diagnosis. In: GRUMEZESCU, A. (ed.). *Fullerenes, graphenes and nanotubes: a pharmaceutical approach*. Norwich: William Andrew, 2018. Cap. 9, p. 331-373. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2020.119827
- 27 DOUGHTY, A. C. V. *et al.* Nanomaterial applications in photothermal therapy for cancer. *Materials*, v. 12, n. 5, p. 1-14, 2019. DOI: 10.3390/ma12050779
- 28 KIM, D.; KIM, H. Induction of apoptotic temperature in photothermal therapy under various heating conditions in multi-layered skin structure. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 20, p. 1-20, 2021. DOI: 10.3390/ijms222011091

- 29 HAN, H. S.; CHOI, K. Y. Advances in nanomaterial-mediated photothermal cancer therapies: toward clinical applications. *Biomedicines*, v. 9, n. 3, p. 1-15, 2021. DOI: 10.3390/biomedicines9030305
- 30 WU, J. *et al.* Heat shock proteins and cancer. *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 38, n. 3, p. 226-256, 2017. DOI: 10.1016/j.tips.2016.11.009.
- 31 MELAMED, J. R.; EDELSTEIN, R. S.; DAY, E. S. Elucidating the fundamental mechanisms of cell death triggered by photothermal therapy. *ACS Nano*, v. 9, n. 1, p. 6-11, 2015. DOI: 10.1021/acsnano.5b00021
- 32 ZHAO, L. *et al.* Recent advances in selective photothermal therapy of tumor. *Journal of Nanobiotechnology*, v. 19, n. 1, p. 1-15, 2021. DOI: 10.1186/s12951-021-01080-3.
- 33 HU, Q, *et al.* Reprogramming tumor microenvironment with photothermal therapy. *Bioconjugate Chemistry*, v. 31, n. 5, p. 1268-1278, 2020. DOI: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00135
- 34 PANDEY, P.*et al.* Nanoemulsion: a novel drug delivery approach for enhancement of bioavailability. *Recent Patents on Nanotechnology*, v. 14, n. 4, p. 276-293, 2020. DOI: 10.2174/1872210514666200604145755
- 35 SHENG, Z.; HU, D.; XUE, M. Indocyanine green nanoparticles for theranostic applications. *Nano-Micro Letters*, v. 5, n. 3, p. 145-150, 2013. DOI: 10.1007/BF03353743
- 36 TOPALOGLU, N.; GULSOY, M.; YUKSEL, S. Antimicrobial photodynamic therapy of resistant bacterial strains by indocyanine green and 809-nm diode laser. *Photomedicine and Laser Surgery*, v. 31, n. 4, p. 155-162, 2013. DOI: 10.1089/pho.2012.3430
- 37 PALLOTTA, O. J.; MCEWEN, M.; PILLER, N. Development and validation of a custom made indocyanine green fluorescence lymphatic vessel imager Development and validation of a custom made vessel imager. *Journal of Biomedical Optics*, v. 20, n. 6, p. 066003, 2020. DOI: 10.1117/1.JBO.20.6.066003
- 38 REINHART, M. B. *et al.* Indocyanine green :historical context, current applications, and future considerations. *Surgical Innovation*, v. 23, n. 2, p. 166-175, 2016. DOI: 10.1177/1553350615604053
- 39 WANG, H. *et al.* Indocyanine green-incorporating nanoparticles for cancer theranostics. *Theranostics*, v. 8, n. 5, p. 1227-1242, 2018. DOI: 10.7150/thno.22872
- 40 EGLOFF-JURAS, C. *et al.* NIR fluorescence-guided tumor surgery: new strategies for the use of indocyanine green. *International Journal of Nanomedicine*, v. 14, p. 7823-7838, 2019. DOI: 10.2147/IJN.S207486. DOI: 10.2147/IJN.S207486
- 41 ALANDER, J. T. *et al.* A review of indocyanine green fluorescent imaging in surgery. *International Journal of Biomedical Imaging*, v. 2012, p. 1-26, 2012. DOI: 10.1155/2012/940585.
- 42 DESMETTRE, T.; DEVOISSELLE, J. M.; MORDON, S. Fluorescence properties and metabolic features of indocyanine green (ICG) as related to angiography. *Survey of Ophthalmology*, v. 45, n. 1, p. 15-27, 2000. DOI: 10.1016/S0039-6257(00)00123-5
- 43 MINDT, S. *et al.* Stability and degradation of indocyanine green in plasma, aqueous solution and whole blood. *Photochemical and Photobiological Sciences*, v. 17, n. 9, p. 1189-1196, 2018. DOI: 10.1039/c8pp00064f

- 44 ZHOU, J. F.; CHIN, M. P.; SCHAFER, S. A. Aggregation and degradation of indocyanine green. *Laser Surgery: advanced characterization, therapeutics, and systems IV*, v. 2128, n. 9, p. 495-505, 1994. DOI: 10.1117/12.184936
- 45 COSCO, E. D.; LIM, I.; SLETTEN, E. M. Photophysical properties of indocyanine green in the shortwave infrared region. *ChemPhotoChem*, v. 5, p. 727-734, 2021. DOI: 10.1002/cptc.202100045.
- 46 LIU, R. *et al.* Nano-sized indocyanine green j-aggregate as a one-component theranostic agent. *Nanotheranostics*, v. 1, n. 4, p. 430-439, 2017. DOI: 10.7150/ntno.19935
- 47 DEMCHENKO, A. P. *Introduction to fluorescence sensing*. Copenhagen: Springer Cham, 2009. DOI: 10.1007/978-1-4020-9003-5
- 48 ROTERMUND, F.; WEIGAND, R.; PENZKOFER, A. J-aggregation and disaggregation of indocyanine green in water. *Chemical Physics*, v. 220, n.3 , p. 385-392, 1997. DOI: 10.1016/S0301-0104(97)00151-1
- 49 SAXENA, V.; SADOQI, M.; SHAO, J. Degradation kinetics of somatostatin in aqueous solution. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 29, n. 9, p. 1027-1033, 2003. DOI: 10.1081/DDC-120025459
- 50 PELLE, G. D. *et al.* Cyanine dyes for photo-thermal therapy : a comparison of synthetic liposomes and natural erythrocyte-based carriers. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 22, n. 13, p. 1-16, 2021. DOI: 10.3390/ijms22136914
- 51 LI, D.; SMITH, B. D. Deuterated indocyanine green (ICG) with extended aqueous storage shelf-life : chemical and clinical implications. *Chemistry - a european journal*, v. 27 p. 14535-14542, 2021. DOI: 10.1002/chem.202102816.
- 52 RÜTTGER, F. *et al.* Isomerization and dimerization of indocyanine green and a related heptamethine dye. *European Journal of Organic Chemistry*, v. 2019, n. 30, p. 4791-4796, 2019. DOI: 10.1002/ejoc.201900715
- 53 OBINU, A. *et al.* Indocyanine green loaded polymeric nanoparticles: physicochemical characterization and interaction studies with caco-2 cell line by light and transmission electron microscopy. *Nanomaterials*, v. 10, n. 1, p. 133, 2020. DOI: 10.3390/nano10010133
- 54 SHENG, Z. *et al.* Smart human serum albumin-indocyanine green nanoparticles generated by programmed assembly for dual-modal imaging-guided cancer synergistic phototherapy. *ACS Nano*, v. 8, n. 12, p. 12310-12322, 2014. DOI: 10.1021/nn5062386
- 55 AMREDDY, N. *et al.* Recent advances in nanoparticle-based cancer drug and gene delivery. *Advanced Cancer Research*, v. 137, p. 115-170, 2019. DOI: 10.1016/bs.acr.2017.11.003.
- 56 LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. *Chemical Reviews*, v. 115, n. 4, p. 1990-2042, 2015. DOI: 10.1021/cr5004198
- 57 ALLISON, R. R. *et al.* Bio-nanotechnology and photodynamic therapy-State of the art review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 5, n. 1, p. 19-28, 2008. DOI: 10.1016/j.pdpdt.2008.02.001
- 58 WANG, S. *et al.* Novel methods to incorporate photosensitizers into nanocarriers for cancer treatment by photodynamic therapy. *Lasers*, v. 43, n. 7, p. 686-695, 2013. DOI: 10.1002/lsm.21113.Novel

- 59 SONG, X.; CHEN, Q.; LIU, Z. Recent advances in the development of organic photothermal nano-agents. *Nano Research*, v. 8, n. 2, p. 340-354, 2015. DOI: 10.1007/s12274-014-0620-y
- 60 MARTIN-SERRANO, Á. *et al.* Nanosystems as vehicles for the delivery of antimicrobial peptides (Amps). *Pharmaceutics*, v. 11, n. 9, p. 1-24, 2019. DOI: 10.3390/pharmaceutics11090448
- 61 WEINER, N.; MARTIN, F.; RIA, M. Liposomes as a drug delivery system. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 15, n. 10, p. 1523-1554, 1989. DOI: 10.3109/03639048909052502
- 62 WOJTYNEKA, M. *et al.* Nanoparticle formulation of indocyanine green improves image guided surgery in a murine model of breast cancer. *Molecular Imaging and Biology*, v. 22, n. 4, p. 891-903, 2020. DOI: 10.1007/s11307-019-01462-y
- 63 FARRAKHOVA, D. *et al.* Photodiagnosis and photodynamic therapy fluorescence imaging analysis of distribution of indocyanine green in molecular and nanoform in tumor model. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 37, n. 11, p. 102636, 2022. DOI: /10.1016/j.pdpdt.2021.102636.
- 64 SINGH, Y. *et al.* Nanoemulsion: concepts, development and applications in drug delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 252, p. 28-49, 2017. DOI: 10.1016/j.jconrel.2017.03.008
- 65 LI, X. *et al.* Nano carriers for drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of Drug Targeting*, v. 25, n. 1, p. 17-28, 2017. DOI: 10.1080/1061186X.2016.1184272
- 66 KIM, Y. R. *et al.* Bioluminescence-activated deep-tissue photodynamic therapy of cancer. *Theranostics*, v. 5, n. 8, p. 805-817, 2015. DOI: 10.7150/thno.11520
- 67 SUTRADHAR, K. B.; AMIN, L. Nanoemulsions: increasing possibilities in drug delivery. *European Journal of Nanomedicine*, v. 5, n. 2, p. 97-110, 2013. DOI: 10.1515/ejnm-2013-0001
- 68 HOU, W. *et al.* A Nanoemulsion with a porphyrin shell for cancer theranostics. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 58, n. 42, p. 14974-14978, 2019. DOI: 10.1002/anie.201908664
- 69 LEE, E. *et al.* Enhancement of indocyanine green stability and cellular uptake by incorporating cationic lipid into indocyanine green-loaded nanoemulsions. *Colloids and Surfaces B : biointerfaces*, v. 136, n. 2015, p. 305-313, 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.09.025
- 70 LEDEZMA, D. K. *et al.* Indocyanine green-nexturastat A-PLGA nanoparticles combine photothermal and epigenetic therapy for melanoma. *Nanomaterials*, v. 10, n. 1, p. 1-20, 2020. DOI: 10.3390/nano10010161
- 71 LEE, Y. H.; LIN, Y. C. Anti-EGFR indocyanine green-mitomycin C-loaded perfluorocarbon double nanoemulsion: a novel nanostructure for targeted photochemotherapy of bladder cancer cells. *Nanomaterials*, v. 8, n. 5, p. 1-18, 2018. DOI: 10.3390/nano8050283
- 72 FUIOR, E. V. *et al.* Evaluation of VCAM-1 targeted naringenin/indocyanine green-loaded lipid nanoemulsions as theranostic nanoplatforms in inflammation. *Pharmaceutics*, v. 12, n. 11, p. 1-21, 2020. DOI: 10.3390/pharmaceutics12111066
- 73 WANG, Y. *et al.* Indocyanine green-loaded perfluorocarbon nanoemulsions for bimodal

- 19 F-magnetic resonance/nearinfrared fluorescence imaging and subsequent phototherapy. *Quantitative Imaging Methods in osteoporosis*, v. 3, n. 3, p. 132-140, 2013. DOI: 10.3978/j.issn.2223-4292.2013.06.03
- 74 SILVEIRA, C. E. G. Analysis of a decade of skin cancer prevention using a mobile unit in Brazil. *Rural and Remote Health*, v. 110, n. 9, p. 1-5, 2019. DOI: 10.22605/RRH4599.
- 75 NADER, M. G. *et al.* Trends in Melanoma Mortality in Brazil: a registry-based study. *JCO Global Oncology*, v. 6, n. 2020, p. 1766-1771, 2020. DOI: 10.1200/GO.20.00426.
- 76 LEONARDI, G. C. *et al.* Cutaneous melanoma: from pathogenesis to therapy (Review). *International Journal of Oncology*, v. 52, n. 4, p. 1071-1080, 2018. DOI: 10.22605/RRH4599
- 77 DA VEIGA, C. R. P. *et al.* Cutaneous melanoma: cost of illness under Brazilian health system perspectives. *BMC Health Services Research*, v. 21, n. 1, p. 1-14, 2021. DOI: 10.1186/s12913-021-06246-1
- 78 HARTMAN, R. I.; LIN, J. Y. Cutaneous Melanoma—a review in detection, staging, and management. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v. 33, n. 1, p. 25-38, 2019. DOI: 10.1016/j.hoc.2018.09.005.
- 79 MESSINA, M. C. Guidelines of the Brazilian Dermatology Society for diagnosis, treatment and follow up of primary. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, v. 90, n. 6, p. 851-861, 2015. DOI: 10.1590/abd1806-4841.20154707
- 80 DAVIS, L. E.; SHALIN, S.C.; TACKETT, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biology & Therapy*, v. 20, n. 11, p. 1366-1379, 2019. DOI: 10.1080/15384047.2019.1640032.
- 81 PAVRI, S. N. *et al.* Malignant melanoma: beyond the basics. *Plastic and Reconstructive Surgery*, v. 138, n. 2, p. 330-340, 2016. DOI: 10.1097/PRS.0000000000002367
- 82 HONORS, C. N.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy for metastatic melanoma treatment: a review. *Technology in Cancer Research & Treatment*, v. 17, n. , p. 1-15, 2018. DOI: 10.1177/1533033818791795
- 83 TANG, J. Q. *et al.* Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment. *International Journal of Cancer*, v. 141, n. 4, p. 646-653, 2017. DOI: 10.1002/ijc.30708
- 84 MARTINELLI, L. P. *et al.* Optical clearing agent increases effectiveness of photodynamic therapy in a mouse model of cutaneous melanoma: an analysis by Raman microspectroscopy. *Biomedical Optics Express*, v. 11, n. 11, p. 6516, 2020. DOI: 10.1364/boe.405039
- 85 PIRES, L. *et al.* Dual-agent photodynamic therapy with optical clearing eradicates pigmented melanoma in preclinical tumor models. *Cancers*, v. 12, n. 7, p. 1-17, 2020. DOI: 10.3390/cancers12071956
- 86 HWANG, J. JIN, J. O. Attachable hydrogel containing indocyanine green for selective photothermal therapy against melanoma. *Biomolecules*, v. 10, n. 8, p. 1-13, 2020. DOI: 10.3390/biom10081124
- 87 MUNDRA, V. *et al.* Micellar formulation of indocyanine green for phototherapy of melanoma. *Journal of Controlled Release*, v. 220, p. 130-140, 2015. DOI: 10.1016/j.jconrel.2015.10.029
- 88 PATTERSON, M. S.; WILSON, B. C.; GRAFF, R. In vivo tests of the concept of

- photodynamic threshold dose in normal rat liver photosensitized by aluminum chlorosulphonated phthalocyanine. *Photochemistry and Photobiology*, v. 51, n. 3, p. 343-349, 1990. DOI: 10.1111/j.1751-1097.1990.tb017
- 89 SUGUMAR, S. *et al.* Ultrasonic emulsification of eucalyptus oil nanoemulsion: antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* and wound healing activity in Wistar rats. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 21, n. 3, p. 1044-1049, 2014. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.10.021.
- 90 RODRIGUES, F. V. S. *et al.* Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone. *Química Nova*, v. 41, n. 7, p. 756-761, 2018. DOI: 10.21577/0100-4042.20170247
- 91 WILHELM, S. *et al.* Analysis of nanoparticle delivery to tumors. *Nature Reviews/Materials*, v. 1, n. 16014, p. 1-12, 2016. DOI: 10.1038/natrevmats.2016.14
- 92 GUPTA, A. *et al.* Nanoemulsions: formation, properties and applications. *Soft Matter*, v. 12, n. 11, p. 2826-2841, 2016. DOI: 10.1039/c5sm02958a
- 93 BLUM, F. *et al.* High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*, v. 75, n. 2, p. 18-21, 2014. DOI: 10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18
- 94 LANE, S. Coupled chromatography–mass spectrometry techniques for the analysis of combinatorial libraries. In: VALKÓ, K. (ed.). *Handbook of analytical separations*. Amsterdam: Elsevier Science, 2020. v. 8, Cap. 4, p. 143-195. DOI: 10.1016/B978-0-444-64070-3.00004
- 95 ENGEL, E. *et al.* Light-induced decomposition of indocyanine green. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, v. 49, n. 5, p. 1777-1783, 2008. DOI: 10.1167/iovs.07-0911
- 96 HOL, M.; KOLÁ, L.; NOBILIS, M. High-performance liquid chromatography – tandem mass spectrometry in the identification and determination of phase I and phase II drug metabolites, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, v. 391, p. 59-78, 2008. DOI: 10.1007/s00216-008-1962-7.
- 97 GRIFFITHS, W. J.; WANG, Y. Lipidomics in metabolomics In: BRAHME, A. (ed.). *Comprehensive biomedical physics*. Amsterdam: Elsevier, 2014. v. 6, p. 157-164. DOI: 10.1016/B978-0-444-53632-7.01113-8.
- 98 NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *Sodium*. 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/element/Sodium> Acesso em: 10 jun. 2022
- 99 NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. *Hydrogen*. 2022. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/element/Hydrogen> Acesso em: 10 jun. 2022
- 100 ATTIA, M. *et al.* Optical properties of indocyanine green under ultrasound treatment. *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 2, n. 9, p. 100005, 2020. DOI: 10.1016/j.jpap.2020.100005
- 101 PHILIP, R. *et al.* Absorption and fluorescence spectroscopic investigation of indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: chemistry*, v. 96, n. 1-3, p. 137-148, 1996. DOI: 10.1016/1010-6030(95)04292-X
- 102 FERNANDEZ-FERNANDEZ, A. *et al.* Comparative study of the optical and heat generation properties of IR820 and indocyanine green. *Molecular Imaging*, v. 11, n. 2, p. 99-

113, 2012. DOI: 10.2310/7290.2011.00031

103 BRICKS, J. L. *et al.* Fluorescent J-aggregates of cyanine dyes: Basic research and applications review. *Methods and Applications in Fluorescence*, v. 6, n. 1, p. 1-31, 2018. DOI: 10.1088/2050-6120/aa8d0d

104 CAYMAN CHEMICAL. Indocyanine green. 2019 Disponível em: <https://www.caymanchem.com/product/27462/indocyanine-green>. Acesso em: 10 jun. 2022.

105 WEIGAND, R.; ROTERMUND, F.; PENZKOFER, A. Aggregation dependent absorption reduction of indocyanine green. *Journal of Physical Chemistry A*, v. 101, n. 42, p. 7729-7734, 1997. DOI: 10.1021/jp9700894

106 JELLEY, E. E. Spectral absorption and fluorescence of dyes in the molecular state. *Nature*, v. 139, p. 1009-1010, 1936. DOI: 10.1038/1381009a0

107 CHANGALVAIE, B. *et al.* Indocyanine green J aggregates in polymersomes for near-infrared photoacoustic imaging. *ACS Applied Materials & Interfaces*, v. 11, n. 50, p. 46437-46450, 2019. DOI: 10.1021/acsami.9b14519

108 JUNG, B.; VULLEV, V. I.; ANVARI, B. Revisiting indocyanine green: effects of serum and physiological temperature on absorption and fluorescence characteristics. *IEEE Journal on Selected Topics in Quantum Electronics*, v.20 , n. 2, p. 7000409 , 2014. DOI: 10.1109/JSTQE.2013.2278674

109 SIGMA ALDRICH. Indocyanine green. 2003 Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt/product/aldrich/228869> Acesso em: 10 jun. 2022.

110 KLEIMAN, M.; RYU, K. A.; ESSER-KAHN, A. P. Determination of factors influencing the wet etching of polydimethylsiloxane using tetra-n-butylammonium fluoride. *Macromolecular Chemistry and Physics*, v 217, n. 3, p. 284-291, 2018. DOI: 10.1002/macp.201500225

111 BJÖRNSSON, B. O. G.; MURPHY, R.; CHADWICK, V. S. Physicochemical studies on indocyanine green : molar lineic absorbance, pH tolerance, activation energy and rate of decay in various solvents. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry*, v. 21, n. 7, p. 453-458, 1983. DOI: 10.1515/cclm.1983.21.7.453

112 MOHAN, C. *A guide for the preparation and use of buffers in biological systems*. 3rd ed. Novagen: EMD Biosciences, 2006.

113 KIRSTEIN, S.; DAEHNE, S. J-aggregates of amphiphilic cyanine dyes: self-organization of artificial light harvesting complexes. *International Journal of Photoenergy*, v. 2006, p. 1-21, 2006. DOI: 10.1155/IJP/2006/20363

114 YUAN, B.; CHEN, N.; ZHU, Q. Emission and absorption properties of indocyanine green in Intralipid solution. *Journal of Biomedical Optics*, v. 9, n. 3, p. 1-16, 2004. DOI: 10.1002/chem.201502240

115 KUMARI, A.; GUPTA, S. Two-photon excitation and direct emission from S₂ state of U.S. Food and Drug Administration approved near-infrared dye: Application of anti-Kasha's rule for two-photon fluorescence imaging. *Journal of Biophotonics*, v. 12, n. 1, p. 1-7, 2019. DOI: 10.1117/1.1695411

116 D'ANNA, F. *et al.* Aggregation processes of perylene bisimide diimidazolium salts.

Chemistry - a European journal, v. 21, n. 42, p. 14780-14790, 2015. DOI: 10.1002/jbio.201800086

117 WÜRTHNER, F.; KAISER, T. E.; SAHA-MÖLLER, C. R. J-aggregates: From serendipitous discovery to supramolecular engineering of functional dye materials. *Angewandte Chemie International Edition*, v. 50, n. 15, p. 3376-3410, 2011. DOI: 10.1002/anie.201002307

118 HOLZER, W. *et al.* Photostability and thermal stability of indocyanine green. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: biology*, v. 47, n. 2-3, p. 155-164, 1998. DOI: 10.1016/S1011-1344(98)00216-4

119 MIRANDA, D. *et al.* Highly-soluble cyanine J-aggregates entrapped by liposomes for in vivo optical imaging around 930 nm. *Theranostics*, v. 9, n. 2, p. 381-390, 2019. DOI: 10.7150/thno.28376

120 DEMCHENKO, A. P. Photobleaching of organic fluorophores: quantitative characterization, mechanisms, protection. *Methods and Applications in Fluorescence*, v. 8, n. 2, p. 1-25, 2020. DOI: 10.1088/2050-6120/ab7365

121 PICCHIO, M. L. *et al.* Exploiting cyanine dye J-aggregates/monomer equilibrium in hydrophobic protein pockets for efficient multi-step phototherapy: an innovative concept for smart nanotheranostics. *Nanoscale*, v. 13, n. 19, p. 8909-8921, 2021. DOI: 10.1039/d0nr09058a

122 SU, M. *et al.* A supramolecular strategy to engineering a non-photobleaching and near-infrared absorbing nano-J-aggregate for efficient photothermal therapy. *ACS Nano*, v. 15, n. 3, p. 5032-5042, 2021. DOI: 10.1021/acsnano.0c09993

123 CLUTTER, E. D.; CHEN, L.L.; WANG, R. R. Role of photobleaching process of indocyanine green for killing neuroblastoma cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 589, p. 254-259, 2021. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.12.033.

124 MAZIUKIEWICZ, D. *et al.* NDs@PDA@ICG conjugates for photothermal therapy of glioblastoma multiforme. *Biomimetics*, v. 4, n. 1, p. 1-17, 2019. DOI: 10.1016/j.bbrc.2021.12.033

125 CHEUNG, C. C. L. *et al.* Liposome-templated indocyanine green J-aggregates for *in vivo* near-infrared imaging and stable photothermal heating. *Nanotheranostics*, v. 4, n. 2, p. 91-106, 2020. DOI: 10.7150/ntno.41737

126 GAO, D. *et al.* Molecular engineering of near-infrared light-responsive BODIPY-based nanoparticles with enhanced photothermal and photoacoustic efficiencies for cancer theranostics. *Theranostics*, v. 9, n. 18, p. 5315-5331, 2019. DOI: 10.7150/thno.34418

127 PAKULA, A. A Tissue-mimicking prostate phantom for 980nm laser interstitial thermal therapy. *Methods Molecular Biology*, v. 176, n. 5, p. 139-148, 2019. DOI: 10.1080/02656736.2019.1660811

128 TAKAGI, R. *et al.* A visualization method for a wide range of rising temperature induced by high-intensity focused ultrasound using a tissue-mimicking phantom. *International Journal of Hyperthermia*, v. 39, n. 1, p. 22-33, 2022. DOI: /10.1080/02656736.2021.2012603.

129 SAPARETO, S. A.; DEWEY, W. C. Thermal dose determination in cancer therapy. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*. v. 10, n. 6, p. 787-800, 1984. DOI: 10.1016/0360-3016(84)90379-1

130 HAPPONEN, E. *et al.* Thermal dose as a universal toll to evaluate nanoparticle-induced photothermal therapy. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 587, n. 7, p. 119657, 2020. DOI: 10.1016/j.ipharm.2020.119657

131 YE, Y. *et al.* A melanin-mediated cancer immunotherapy patch. *Science Immunology*, v. 2, n. 17, p. 1-13, 2017. DOI: 10.1126/sciimmunol.aan5692

132 DE OCA-ÁVALOS, J. M. M.; CANDAL, R. J.; HERRERA, M. L. Nanoemulsions: stability and physical properties. *Current Opinion in Food Science*, v. 16, n. , p. 1-6, 2017. DOI: 10.1016/j.cofs.2017.06.003

133 GUERRERO, S. *et al.* Curcumin-loaded nanoemulsion: a new safe and effective formulation to prevent tumor recurrence and metastasis. *Nanoscale*, v. 10, n. 47, p. 22612-22622, 2018. DOI: 10.1039/c8nr06173d

134 ABADEER, N. S.; MURPHY, C. J. Recent progress in cancer thermal therapy using gold nanoparticles. *Journal of Physical Chemistry C*, v. 120, n. 9, p. 4691-4716, 2016. DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b11232

Anexo A – Certificado de aprovação do comitê de ética



**COMISSÃO DE ÉTICA
NO USO DE ANIMAIS**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Otimização da Terapia Fotodinâmica para tratamento do melanoma cutâneo, analisando tipos de fotossensibilizadores e associação com agentes clareadores ópticos", protocolada sob o CEUA nº 5590171120, sob a responsabilidade de **Leticia Palombo Martinelli e equipe; Lilian Tan Moriyama; Lucas Danilo Dias; Michelle Barreto Requena; Cristina Kurachi** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata(exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Instituto de Física de Sao Carlos - Universidade de Sao Paulo (CEUA/IFSC) na reunião de 04/01/2021.

We certify that the proposal "Optimization of Photodynamic Therapy for the treatment of cutaneous melanoma, analyzing types of photosensitizers and association with optical clearing agents", utilizing 152 Heterogenics mice (152 females), protocol number CEUA 5590171120, under the responsibility of **Leticia Palombo Martinelli and team; Lilian Tan Moriyama; Lucas Danilo Dias; Michelle Barreto Requena; Cristina Kurachi** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Physics Institute of Sao Carlos - Sao Paulo University (CEUA/IFSC) in the meeting of 01/04/2021.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa (Acadêmica)**

Vigência da Proposta: de **12/2020** a **12/2024**

Área: **Grupo de Óptica / Fcm**

Origem: **Biotério Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Fêmeas** idade: **5 a 6 semanas** N: **152**

Linhagem: **Balb C tipo nude**

Peso: **10 a 15 g**

Local do experimento: Laboratório de Biotônica e de experimentação animal

Sao Carlos, 04 de janeiro de 2021

Prof. Dr. Fernando Fernandes Paiva
de Ética no Uso de Animais

Instituto de Física de Sao Carlos - Universidade de Sao Paulo
Sao Paulo

Profa. Dra. Ana Paula Ulian de Araújo Coordenador da Comissão
Animais
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de

Instituto de Física de Sao Carlos - Universidade de