

Universidade do Vale do Paraíba  
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento  
Mestrado Profissional em Processamento de Materiais

Bruna Cristina dos Santos Pinto

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo cloro-alumínio-ftalocianina para potencial uso na terapia fotodinâmica**

São José dos Campos  
2022

Bruna Cristina dos Santos Pinto

**Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona contendo cloro-alumínio-ftalocianina para potencial uso na terapia fotodinâmica em células**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Processamento de Materiais.

Orientador: Prof. Dr. Milton Beltrame Júnior

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreza Ribeiro Simioni

São José dos Campos  
2022

## TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

### Ficha catalográfica

Pinto, Bruna Cristina dos Santos

Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas de poli-e-caprolactona contendo cloro-alumínio-ftalocianina para potencial uso na terapia fotodinâmica / Bruna Cristinados Santos Pinto; orientador, Milton Beltrame Júnior; co-orientadora Andreza Ribeiro Simioni. - São José dos Campos, SP, 2022.

1 CD-ROM, 54 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais.

Inclui referências

1. Processamento de Materiais. 2. nanopartículas. 3. polímeros. 4. nanoprecipitação. 5. fotossensibilizador. I. Beltrame Júnior, Milton, orient. II. Simioni, Andreza Ribeiro, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais. IV. Título.

Eu, Bruna Cristina dos Santos Pinto, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 11 de Abril de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 08 / 03 / 22

**BRUNA CRISTINA DOS SANTOS PINTO**

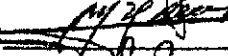
**"DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULAS DE *Poli-ε-caprolactona* CONTENDO CLORO-ALUMÍNIO-FTALOCIANINA PARA POTENCIAL USO NA TERAPIA FOTODINÂMICA."**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

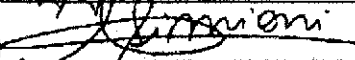
PROF.ª DR.ª ERIKA PETERSON GONÇALVES



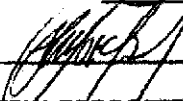
PROF. DR. MILTON BELTRAME JÚNIOR



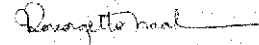
PROF.ª DR.ª ANDREZA RIBEIRO SIMIONI



PROF. DR. LIU YAO CHO



PROF.ª DR.ª ROSE MARY ZUMSTEIN GEORGETTO NAAL - USP



DRA. ISABELA BUENO ROSSETI – Cons. Enfermagem e Laserterapia



Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D - Univap

São José dos Campos, 08 de março 2022.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, por ser essencial em minha vida, pelas oportunidades, pelos problemas e dificuldades, por seu meu guia e ter me sustentado e iluminado até aqui, me dando forças para enfrentar toda e qualquer adversidade.

Agradeço aos meus pais, Patrícia e Marcos, que me ensinaram a ser quem eu sou hoje, por sempre me apoiarem e mostrar o melhor caminho. Desculpem-me pelos momentos ausentes e sem paciência durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus irmãos e cunhado, Bianca, Lucas e Bruno, por terem me incentivado e apoiado nesta caminhada, que entenderam e compreenderam os momentos de estresse e por terem paciência.

A minha amiga Dominique, pelas palavras de conforto e calma, por ter me aguentado nos meus momentos de desespero e por ter me apoiado e incentivado.

A minha amiga e companheira de laboratório, Jéssica, por ser essa amiga incrível, que sempre me ajudou, incentivou e apoiou. Por ter me ajudado em tudo que eu precisei que também aguentou e aguenta meus surtos, pela paciência, dedicação e por todo suporte durante esta jornada.

Aos professores orientadores Prof<sup>o</sup> Dr<sup>o</sup> Milton Beltrame Júnior e a Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andreza Ribeiro Simioni, pelas orientações, sugestões valiosas e estímulos dados.

Em especial agradeço a Prof<sup>a</sup> Andreza, pelos anos de convívio no laboratório, por ter me aberto espaço para fazer parte do grupo desde a graduação. Por sempre se mostrar presente, por sua dedicação, compreensão e ajuda. Sou imensamente grata por tudo o que vivi e aprendi com você ao longo desses anos. Minha eterna gratidão.

A Prof<sup>a</sup> Erika por ter me ajudado e auxiliado não só durante esta jornada, mas também no desenvolvimento da primeira síntese, por ter ficado comigo até tarde no laboratório, pelo apoio e dedicação.

Aos professores e a coordenação do mestrado, pelos esforços, interesse, dedicação e atenção em prol da pesquisa e do crescimento acadêmico, por não desistirem e darem o seu melhor nesses anos que foram de muito desafio. Muito obrigada.

Aos parceiros do laboratório de síntese orgânica, por todo aprendizado e companheirismo nesses últimos anos dentro do grupo. Em especial ao Vitor, por ter me auxiliado e colaborado para o desenvolvimento da síntese.

Aos colegas do Laboratório de Nanossensores, Laboratório de Bioquímica e Central Multiusuário pelo auxílio e cuidado com as amostras durante as análises.

Agradeço ao Instituto Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila (IGTPAN) pela doação de material para desenvolvimento da pesquisa proposta neste trabalho.

Gratidão a cada um de vocês que passaram por minha jornada. Fechar ciclos é importante para entender tudo o que feito, o quanto nos desenvolvemos e aprendemos. É um momento de colher frutos e renovar as energias para que o novo possa começar. Sou eternamente grata por tudo!

## RESUMO

Neste trabalho, nanopartículas do polímero poli-ε-caprolactona (PCL) foram desenvolvidas para encapsular a cloro-alumínio ftalocianina (ClAlPc), como modelo fotossensibilizador para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD). O método de nanoprecipitação foi aplicado para produzir nanopartículas de PCL-ClAlPc que foram caracterizadas por medidas no estado estacionário, tamanho de partícula, potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz, morfologia e eficiência de carregamento. A análise da microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostra claramente a formação de nanopartículas uniformes, de formato esférico, com superfície regular e lisa. O tamanho médio das nanopartículas apresentadas foi de  $266,7 \pm 83,1$  nm com índice de polidispersidade (PDI) de 0,105 e com a eficiência de encapsulamento de 81,8%. As formulações de nanopartículas apresentaram valores de potencial zeta negativos ( $-28,31 \pm 1,25$  mV), explicando sua estabilidade coloidal. O perfil espectral de absorção mostrou que o fotossensibilizador carregado nas nanopartículas não sofre alteração em suas propriedades fotofísicas após o processo de encapsulamento. A ClAlPc encapsulada nas nanopartículas poliméricas apresentou estabilidade física adequada, boas propriedades fotofísicas e fotoquímicas demonstrando a eficiência do carregamento do fármaco. O estudo de liberação de drogas *in vitro* constatou uma taxa de liberação inicial de forma sustentada e eficiente, típica para os medicamentos carregados nas nanopartículas de PCL. A biocompatibilidade e o efeito fotodinâmico das nanopartículas de PCL-ClAlPc foram avaliados por experimentos *in vitro* utilizando a linhagem celular HeLa CCL-2, adenocarcinoma, como modelo biológico. Os estudos mostraram que o sistema não é citotóxico no escuro, mas possuem uma fototoxicidade significativa a  $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de concentração de fotossensibilizador encapsulado e  $10\text{J.cm}^{-2}$  de luz, mostrando, nestas condições, diminuição de sobrevivência maior que 95%. A localização intracelular demonstrou que as nanopartículas encapsuladas com a cloro- alumínio ftalocianina podem ser internalizadas nas células de adenocarcinoma de maneira efetiva. Com isso, os resultados permitem reforçar a proposta de que as nanopartículas de PCL encapsuladas com ClAlPc é um sistema promissor para o uso em protocolos de aplicação em TFD.

**Palavras-Chave:** nanopartículas; polímeros; nanoprecipitação; fotossensibilizador.

# DEVELOPMENT AND CHARACTERIZATION OF POLY-CAPROLACTONE CONTAINING CHLORO-ALUMINUM-PHTHALOCYANINE NANOPARTICLES FOR POTENTIAL USE IN PHOTODYNAMIC THERAPY

## ABSTRACT

In this work, poly-caprolactone (PCL) polymer nanoparticles were developed to encapsulate chloro-aluminum phthalocyanine (ClAlPc), a hydrophobic photosensitizer used in photodynamic therapy (PDT). The nanoprecipitation method was applied to produce PCL-ClAlPc nanoparticles that were characterized by measurements at steady state, particle size, zeta potential, dynamic light scattering, morphology and charging efficiency. The analysis of scanning electron microscopy (SEM) clearly shows the formation of uniform nanoparticles, spherical in shape, with a regular and smooth surface. The average size of the nanoparticles presented was  $266.7 \pm 83.1$  nm with a polydispersity index (PDI) of 0.105 nm and an encapsulation efficiency of 81.8%. The nanoparticle formulations showed negative zeta potential values ( $-28.31 \pm 1.25$  mV), explaining its colloidal stability. The spectral absorption profile showed that the photosensitizer loaded in the nanoparticles does not change its photophysical properties after the encapsulation process. The ClAlPc encapsulated in the polymeric nanoparticles showed adequate physical stability, good photophysical and photochemical properties, demonstrating the efficiency of drug loading. The *in vitro* drug release study found a sustained and efficient initial release rate typical for drugs loaded on PCL nonparticles. The biocompatibility and photodynamic effect of PCL-ClAlPc nanoparticles were evaluated by *in vitro* experiments using the Hela CCL-2 cell line, adenocarcinoma, as a biological model. The studies showed that the system is not cytotoxic in the dark, but has a significant phototoxicity at  $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$  of encapsulated photosensitizer concentration and  $10 \text{ J.cm}^{-2}$  of light, showing, under these conditions, a decrease in survival greater than 95 %. Intracellular localization demonstrated that nanoparticles encapsulated with chloro-aluminum phthalocyanine can be effectively internalized into adenocarcinoma cells. Thus, the results reinforce the proposal that PCL nanoparticles encapsulated with ClAlPc is a promising system for use in PDT application protocols.

**Keywords:** nanoparticles; polymers; nanoprecipitation; photosensitizer.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Escala Nanométrica	12
Figura 2: Estrutura molecular da Acridina e da Eosina.	15
Figura 3: Estrutura monomérica do fotossensibilizador Photofrin®	17
Figura 4: Protocolo de aplicação clínica	18
Figura 5: Mecanismos da TFD (Diagrama de Jablonski simplificado)	18
Figura 6: Classificação dos fotossensibilizadores	21
Figura 7: Estrutura da ftalocianina de cloro-alumínio	22
Figura 8: Estrutura base das ftalocianinas	22
Figura 9: Representação de uma nanoesfera e nanocápsula	24
Figura 10: Estrutura molecular da poli-ε-caprolactona	25
Figura 11: Esquema de síntese das nanopartículas de PCL-CIAIPc	28
Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura: (a) nanopartículas de PCL; (b) nanopartículas de PCL com fotossensibilizador.	35
Figura 13: Espectros de absorção da CIAIPc ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ).	36
Figura 14: a) Espectros de absorção de CIAIPc em diferentes concentrações ( $0,5 - 5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). (b) gráfico da concentração de CIAIPc vs. Absorbância.	37
Figura 15: Distribuição de tamanho medido por DLS medido para o sistema nanoparticulado: (a) nanopartículas de PCL; (b) nanopartículas de PCL com fotossensibilizador.	39
Figura 16: Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de nanopartículas de PCL - CIAIPc monitorada durante 90 dias após a preparação.	40
Figura 17: Espectro FTIR para PCL puro, CIAIPc e híbrido PCL-CIAIPc.	41
Figura 18: Perfil de liberação in vitro para a CIAIPc encapsulada em nanopartículas de PCL.	42
Figura 19: Análise da viabilidade da linhagem celular HeLa CCL-2: (A) FS livre; (B) FS encapsulado. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos: • em comparação com o controle no escuro; ♣ em comparação com o controle de luz. (ANOVA, $p \leq 0,05$ ).	44
Figura 20: Avaliação da localização celular do fotossensibilizador CIAIPc (• livre; ♦ encapsulados em nanopartículas de PCL) em células HeLa CCL-2 usando microscopia confocal. Fluorescência azul: DAPI (marcação nuclear); Fluorescência vermelha.	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TDF	Terapia Fotodinâmica
ClAlPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
DDS	<i>Drug delivery systems</i>
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Eficiência de encapsulamento
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FA	Fase aquosa
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FO	Fase orgânica
FS	Fotossensibilizador
HpD	Derivado de hematoporfirina
IUPAC	União internacional da Química Pura e Aplicada
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
NPs	Nanopartículas Poliméricas
PCL	Poli- $\epsilon$ -caprolactona
PCS	Espectroscopia de correlação de fótons
PDI	Índice de polidispersividade
PLA	Poli(ácido láctico)
PLGA	Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)
$^1\text{FS}^*$	Estado singleto excitado
$^1\text{FS}$	Estado fundamental
$^3\text{FS}^*$	Estado tripleto excitado

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>14</b>
<b>2.1 Câncer</b> .....	<b>14</b>
<b>2.2 Terapia fotodinâmica: Histórico</b> .....	<b>15</b>
<b>2.3 Mecanismo da Terapia Fotodinâmica</b> .....	<b>17</b>
<b>2.4 Fotossensibilizadores</b> .....	<b>19</b>
<b>2.5 Ftalocianinas</b> .....	<b>21</b>
<b>2.6 Sistema de Liberação Controlada de Fármacos</b> .....	<b>23</b>
<b>2.7 Nanopartículas de poli-<math>\epsilon</math>-caprolactona (PCL)</b> .....	<b>24</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo Geral</b> .....	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos Específicos</b> .....	<b>26</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1 Materiais</b> .....	<b>27</b>
<b>4.2 Síntese de nanopartículas PCL</b> .....	<b>27</b>
<b>4.3 Caracterização Morfológica</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4 Espectroscopia de absorção UV-Vis</b> .....	<b>29</b>
<b>4.5 Determinação do tamanho por espalhamento dinâmico de luz (DLS)</b> .....	<b>29</b>
<b>4.6 Determinação do potencial zeta</b> .....	<b>29</b>
<b>4.7 Rendimento do processo (%)</b> .....	<b>30</b>
<b>4.8 Eficiência de encapsulamento (EE)</b> .....	<b>30</b>
<b>4.9 Avaliação do desempenho de liberação do fármaco in vitro</b> .....	<b>30</b>
<b>4.10 Estudos espectroscópicos no infravermelho</b> .....	<b>31</b>
<b>4.11.A Culturas de células</b> .....	<b>31</b>
<b>4.11.B Ensaio de citotoxicidade da nanoformulação</b> .....	<b>31</b>
<b>4.11.C Ensaio de fotocitotoxicidade da nanoformulação</b> .....	<b>32</b>
<b>4.12 Ensaio de viabilidade pelo método de exclusão por azul de tripan</b> .....	<b>32</b>
<b>4.13 Internalização celular</b> .....	<b>33</b>
<b>4.14 Análise estatística</b> .....	<b>33</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>34</b>
<b>5.1 Síntese das nanopartículas de PCL</b> .....	<b>34</b>
<b>5.2 Caracterização Morfológica</b> .....	<b>35</b>
<b>5.3 Estudos espectroscópicos no estado estacionário</b> .....	<b>36</b>
<b>5.4 Caracterização físico-química de nanopartículas de PCL-CIAIPc</b> .....	<b>38</b>
<b>5.5 Análise FTIR</b> .....	<b>41</b>
<b>5.6 Estudos de liberação in vitro</b> .....	<b>42</b>
<b>5.7 Teste de exclusão e viabilidade celular por azul de tripan</b> .....	<b>43</b>
<b>5.8 Internalização celular</b> .....	<b>45</b>
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	<b>48</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>49</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer, após as doenças cardiovasculares, é considerado um grande problema de saúde mundial visto que possui uma das maiores taxas de mortalidade no mundo (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005; HOSSEINZADEH; KHORSANDI, 2019). Tal morbidade é consequência do crescimento irregular dos tecidos, sendo considerado maligno quando seu crescimento se dá de maneira acelerada e desorganizada podendo irradiar para outros órgãos (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

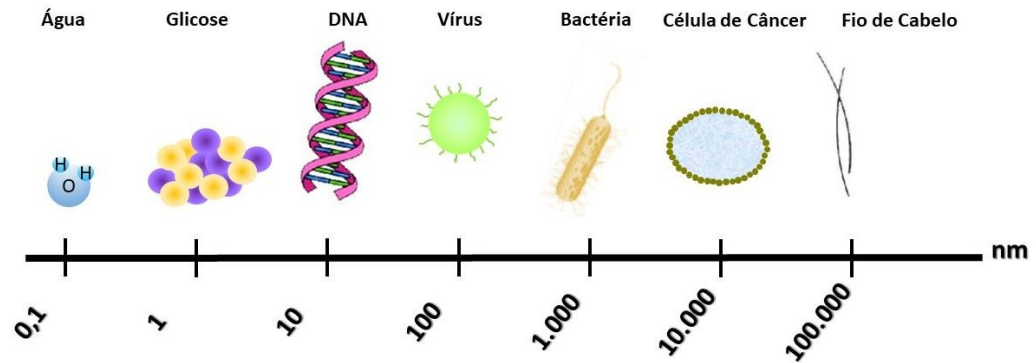
Os métodos mais utilizados, atualmente, para tratar os pacientes com câncer são radioterapia, quimioterapia e cirurgia. Em muitos casos, é necessário combinar mais de uma modalidade, como no tratamento do câncer de mama, no qual após a cirurgia é indicado complementação com radioterapia. No entanto, esses métodos não atingem somente o tecido tumoral e apresentam uma série de reações adversas que acabam impactando de maneira negativa a qualidade de vida dos pacientes, tanto pelo efeito dos enjoos e fadiga, quanto pela queda de cabelo (INCA, 2021a).

Os recentes avanços no desenvolvimento de nanomateriais para aplicações na área da saúde têm mudado tal cenário com alternativas e eficientes modalidades terapêuticas, com o intuito de diminuir esses efeitos colaterais e proteger o tecido saudável (EL-KENAWY *et al.*, 2017).

Segundo Zazo, Colino e Lanao (2016), a FDA e a IUPAC consideram “nano” qualquer produto com propriedades ou fenômenos atribuíveis às suas dimensões, mesmo que essas dimensões estejam fora da faixa de 1 a 100 nm, em razão aos diferentes métodos existentes para preparar o sistema nanoestruturado (ZAZO; COLINO; LANAO., 2016; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A nanotecnologia tem gerado um impacto significativo em quase todos os aspectos da ciência, pois trata da caracterização, síntese e aplicação de materiais com novas propriedades devido ao seu pequeno tamanho, possibilitando a criação de materiais que se comportam de maneira distinta da sua forma macroscópica. Para facilitar a compreensão do tamanho nanométrico, podemos observar na Figura 1 que o raio da fibra do DNA mede aproximadamente 10 nm e que uma célula de câncer tem aproximadamente 10.000 nm (BERWIG; ENGELMANN, 2017).

Figura 1: Escala Nanométrica



Fonte: O Autor

Dentre as modalidades terapêuticas que têm sido propostas para tratamento oncológico, destaca-se a Terapia Fotodinâmica (TFD), uma tecnologia que tem mostrado muitas vantagens com relação aos tratamentos convencionais (quimioterapia, radioterapia e cirurgia), visto que apresenta efeitos colaterais menores, é pouco invasiva, mais seletiva, custo reduzido e diminui a resistência aos medicamentos (GUERRA; GALLO; MENDONÇA, 2005; FADEEL; KAMEL; FADEL, 2020).

O mecanismo da TFD consiste na administração de um fotossensibilizador (FS) que se acumula preferencialmente nas células com malignidade. Essas são posteriormente irradiadas por uma fonte de luz em um comprimento de onda específico na faixa 600-800nm, as quais são capazes de absorver esta energia proveniente da luz irradiada e transferem parte desta energia absorvida para outras biomoléculas, como o oxigênio intracelular provocando processos fotooxidativos na célula em que houve penetração do FS gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) como o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), capaz de causar danos ao tecido alvo (WAN; LIN., 2014; SIMELANE; CHERIE; ABRAHAMSE, 2020).

O sucesso da TFD depende da escolha de um FS com forte absorção do espectro na região do vermelho permitindo uma melhor ação fototerapêutica. Dentre os FS existentes destacam-se as ftalocianinas, consideradas compostos de segunda geração. São eficientes geradoras de oxigênio singlete, possuem baixa toxicidade e uma forte absorção na região do vermelho na faixa dos comprimentos de onda de 650 a 800nm permitindo assim uma maior penetração nos tecidos. O metal central possui forte influência na ação fotossensibilizadora das ftalocianinas, como é o caso da ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc), sendo considerada uma das mais promissoras deste grupo para aplicação em TFD (KOU; DOU; YANG, 2017; SILVA *et al.*, 2015).

As ftalocianinas apresentam características que diminuem a sua ação fotodinâmica como a baixa solubilidade em meio fisiológico que acarreta dificuldade em sua administração. O uso da nanotecnologia para melhorar a liberação do fotossensibilizador nas células tumorais tem sido promissor e o desenvolvimento de nanomateriais tem se tornando cada vez mais importante no campo da pesquisa. Dentre os novos nanodispositivos, destaca-se o que possui a técnica conhecida na literatura como sistema de liberação controlada para fármacos, também conhecido como “*Drug Delivery Systems*” (DDS), uma técnica que visa aumentar a eficácia de liberação do fármaco, direcionamento específico nas células alvo, diminuindo a toxicidade, os efeitos colaterais e a necessidade de várias doses se comparado com os tratamentos convencionais, melhorando a aceitação do paciente ao tratamento (CALIXTO *et al.*, 2016; DIANZANI *et al.*, 2014; BRYN *et al.*, 2016).

Esta tecnologia pode contribuir de maneira significativa para o progresso científico visto que envolve diferentes aspectos multidisciplinares podendo contribuir de uma maneira expressiva para o avanço da saúde humana. Atualmente, existem muitos trabalhos que estão focados na preparação de nanomateriais bem definidos em termos de tamanho e forma, contribuindo significativamente no comportamento dos nanomateriais *in vivo*.

Dentre os métodos existentes para a formulação de nanopartículas, existe a técnica de nanoprecipitação, que tem sido bastante utilizada por ser um método simples, rápido, reprodutível e capaz de formar nanoesferas e nanocápsulas. O método envolve três componentes básicos i) polímero; ii) solvente de polímero e iii) o “não solvente” do polímero, que na maioria das vezes é a água (LINO *et al.*, 2020). Dentre os polímeros comumente utilizados para desenvolver nanopartículas pelo método exposto podemos citar a poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) que se destaca principalmente por sua biocompatibilidade.

Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas de PCL encapsulando o CIAIPc e avaliar o potencial do agente fotossensibilizador nanoencapsulado para aplicação em fotoprocessos. O campo da distribuição de medicamentos, os nanomedicamentos encapsulados têm chamado a atenção de muitos cientistas pelo fato de que os materiais em nanoescala estão sendo desenvolvidos para aplicações de entrega de fármacos de maneira mais direta nos alvos biológicos desejados.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer

Atualmente, no Brasil, desconsiderando a pandemia da COVID-19, a incidência de doenças neoplásicas vem crescendo significativamente tornando-se uma das doenças que mais causam morte no país (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002). Segundo Li and Kumacheva, em 2015, mais de 15 milhões de casos de câncer foram registrados no mundo e 8,8 milhões desses pacientes vieram a óbito em consequência da doença (LI; KUMACHEVA., 2018).

De acordo com as informações publicadas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA) no livro “Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil”, é estimado 625 mil novos casos de câncer no país, para cada ano do triênio 2020-2022. O câncer de pele não melanoma será o mais incidente (177 mil), seguido pelos cânceres de mama e próstata (66 mil cada), cólon e reto (41 mil), pulmão (30 mil) e estômago (21 mil) (INCA, 2019).

O desenvolvimento do câncer está associado a diversos fatores, entre eles, predisposição genética, estilo de vida, hábitos alimentares, envelhecimento populacional. Fatores ambientais estão entre 80% e 90% dos casos de câncer associados a causas externas (LI; KUMACHEVA., 2018; SINGH *et al.*, 2017; INCA, 2021b).

Os métodos mais utilizados, atualmente, para tratar os pacientes com câncer são ressecção cirúrgica, quimioterapia e radioterapia. A doença quando diagnosticada precocemente pode ser controlada ou mesmo curada. A cirurgia é o tripé para o tratamento e deve estar combinada com outras duas modalidades terapêuticas, como a quimioterapia e a radioterapia, gerando melhores resultados tanto para pacientes em fase inicial quanto para aqueles que possuem metástases (fase terminal) (EL-KENAWY *et al.*, 2017; INCA, 2021c). No entanto, esses tratamentos geralmente apresentam uma série de reações adversas como efeitos colaterais sistêmicos, alta taxa de toxicidade para o sistema imunológico e desenvolvimento de resistências aos fármacos, além de atacar células consideradas normais (SANTOS *et al.*, 2019; ZHOU *et al.*, 2020). Essas alterações podem permanecer durante todo o recurso terapêutico, ocasionando resistência a estes tratamentos afetando a qualidade de vida dos pacientes.

Com isso, os recentes avanços da nanotecnologia levaram os pesquisadores a investigarem novas maneiras de tratamento e a entrega de fármacos fotossensibilizadores

possibilita aumento na eficácia do tratamento, redução da toxicidade e melhorias nas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas das novas nanoestruturas.

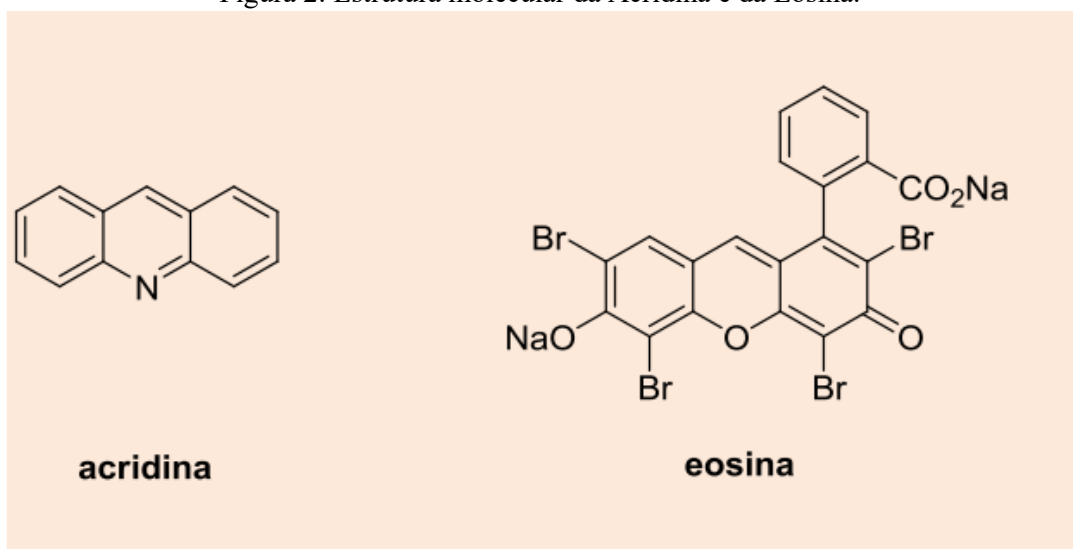
## 2.2 Terapia fotodinâmica: Histórico

Com a finalidade de desenvolver novas alternativas para tratamentos oncológicos, a Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma tecnologia que vêm recebendo grande destaque na comunidade acadêmica e médica, por inúmeros fatores, entre eles, pelo fato de ser mais seletiva ao tecido doente, quando as células são expostas a um fotossensibilizador, luz em comprimento de onda adequado e oxigênio. Devido a esta seletividade, o tratamento possibilita uma baixa toxicidade sistêmica, diminutos efeitos colaterais e com a vantagem de poder ser aplicada mais de uma vez, em um curto espaço de tempo.

O interesse pelo uso da combinação de corantes fotossensíveis e luz com a finalidade de tratar doenças teve início no Egito Antigo, com o uso combinado de extratos de plantas que continham psoralenos e exposição a luz solar, a fim de tratar psoríase e vitiligo (CALIXTO *et al.*, 2016).

No entanto, foi somente em 1900 que os estudos da TFD começaram a ser investigados cientificamente, quando um estudante de medicina Oscar Raab, com o auxílio de seu professor Herman von Tappeiner em Munique, notou que ao expor um protozoário *Paramecium caudatum*, com o corante laranja acridina (Figura 2) a luz solar ele apresentou rápida inatividade, permitindo identificar um fotossensibilizante (CALIXTO *et al.*, 2016; ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

Figura 2: Estrutura molecular da Acridina e da Eosina.



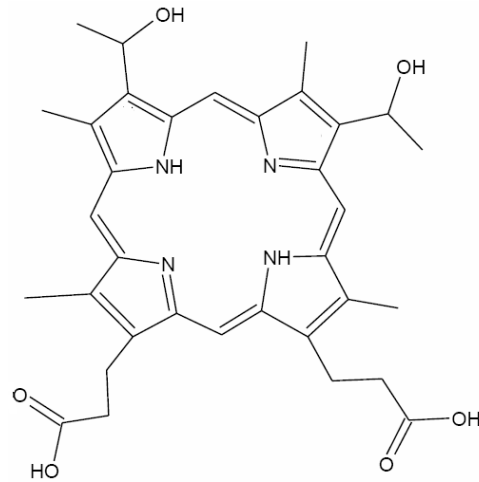
Fonte: Adaptado de Oliveira *et al* (2015).

Mais tarde, dando continuidade aos estudos, Tappeiner após realizar vários experimentos descobriu a necessidade de oxigênio se fazer presente durante a reação. Tappeiner também notou que outros compostos fotossensibilizantes poderiam ser utilizados e seriam capazes de induzir apoptose, como a eosina que, combinada a luz, poderia ser utilizada para tratar tumores cutâneos (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). Os pesquisadores acreditavam que a eosina e a acridina, após serem incorporadas na célula, e irradiadas com comprimento de onda adequado na presença de oxigênio produziam uma reação citotóxica, que ficou conhecido como “ação fotodinâmica”, a qual posteriormente deu origem a técnica que passou a ser chamada de Terapia Fotodinâmica (TFD). Contudo, na época, os estudos relacionados com aplicação de fotossensibilizadores não mostraram bons resultados, fazendo com que diminuíssem consideravelmente o uso da técnica.

Um tempo depois, na década de 50, Schwartz (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002) deu início aos estudos de novos fotossensibilizadores sintetizando uma mistura chamada hematoporfirina (HpD), que culminou com o surgimento dos primeiros fotossensibilizadores sintéticos, sendo considerada a primeira geração de fármacos fotossensibilizadores para aplicação em TFD (UCHOA; BAPTISTA, 2007; SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

A partir da década de 70, vários testes utilizando derivados porfirínicos começaram a ser testados, culminando no desenvolvimento do Photofrin® (Figura 3). Estudos realizados com este medicamento, mostraram bons resultados para o tratamento tumoral, sendo então aprovado em 22 de dezembro de 1998 pela FDA/EUA (Food and Drug Administration) para tratamento do câncer empregando a técnica de TFD (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002; YOON; LI; SHI, 2013).

Figura 3: Estrutura monomérica do fotossensibilizador Photofrin®



Fonte: O Autor.

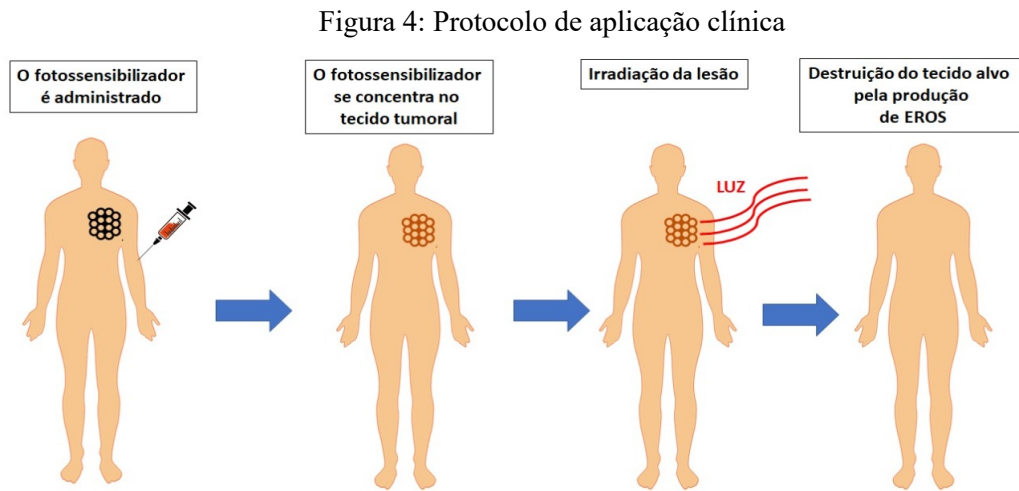
A primeira geração de fotossensibilizadores é composta por derivados da hematoporfirina e seus análogos comerciais. A busca por novos fotossensibilizadores, chamados de segunda geração, levou a compostos com propriedades fotofísicas melhoradas em relação ao Photofrin®. Por isso, a TFD tem se tornado uma técnica promissora não só para o tratamento de doenças oncológicas, como também no combate de doenças causadas por bactérias, psoríase, acne, micose entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2015; ABREU *et al.*, 2019a).

### 2.3 Mecanismo da Terapia Fotodinâmica

A TFD, como escrito anteriormente, é uma modalidade que inclui a combinação do composto fotossensibilizador (FS), irradiação de luz em comprimento de onda específico – geralmente na região do vermelho ou infravermelho para que haja maior penetração do FS no tecido – e oxigênio molecular culminando na produção de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singleto.

O fármaco pode ser administrado no paciente via tópica, sistêmica ou parenteral. O processo envolve a administração do FS que se acumula na célula tumoral, e aguarda o tempo necessário para ocorrer o maior acúmulo do fármaco no sítio patogênico. Em seguida, a região é irradiada por uma fonte luminosa com comprimento de onda específico dentro da janela terapêutica, levando o fármaco a produzir espécies reativas de oxigênio (EROS), como o oxigênio singleto, capaz de induzir a inviabilização das células a partir da inibição da atividade

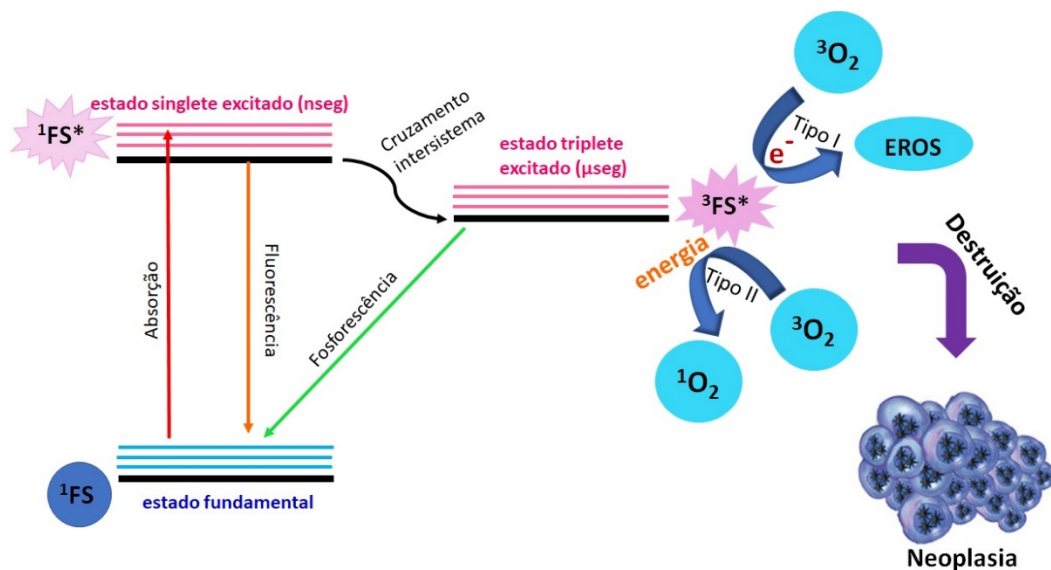
mitocondrial, ocasionando apoptose ou necrose das células cancerígenas citotóxicas (PY-DANIEL *et al.*, 2016; SIMELANE; CHERIE; ABRAHAMSE, 2020) (Figura 4).



Fonte: O Autor

Existe a probabilidade de dois tipos de mecanismo de ação principais da TFD, sendo o passo inicial essencial a excitação eletrônica do FS inicialmente em seu estado fundamental ( $^1\text{FS}$ ), o qual ao ser ativado deve ser excitado espontaneamente de um nível de energia singleto ( $^1\text{FS}^*$ ) para o estado tripleto. Neste estado tripleto excitado ( $^3\text{FS}^*$ ), ocorre outros dois mecanismos de ação (mecanismo do Tipo I e Tipo II), que podem levar os elétrons do  $^3\text{FS}^*$  para seu estado fundamental, a fim de gerar espécies reativas de oxigênio altamente citotóxicas para induzir a morte celular dos tumores (figura 5). (SIMELANE; CHERIE; ABRAHAMSE, 2020).

Figura 5: Mecanismos da TFD (Diagrama de Jablonski simplificado)



Fonte: Adaptado de Santos *et al* (2021)

Na presença de oxigênio, o FS no estado tripleto excitado pode reagir diretamente com um substrato por transferência de elétron, para formar espécies reativas de oxigênio (EROS), tais como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), radical superóxido ( $O_2^{\bullet}$ ) e radical hidroxila ( $\bullet OH$ ), que podem interagir com o oxigênio para produzir produtos oxigenados (mecanismo tipo I). Alternativamente, a energia do  $^3FS^*$  pode ser diretamente transferida para o oxigênio para formar oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) (mecanismo tipo II), sendo este considerado a principal espécie ativa em TFD (BAPTISTA *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2019).

Em geral, existem dois mecanismos de entrega de medicamentos direcionadas ao tumor: o direcionamento ativo e o passivo. Em ambos os casos, as propriedades físico-químicas, juntamente com a possibilidade de funcionalização superficial do nanocarreador, bem como características fisiopatológicas do microambiente tumoral (TME) são os parâmetros utilizados para projetar abordagens de direcionamento de fármacos fotossensíveis (SANTOS *et al.*, 2021).

De acordo com Santos e colaboradores (2021) as rotas de segmentação passivas são mais comuns, devido ao efeito de permeabilidade e retenção aprimorada (EPR). O efeito EPR é geralmente atribuído ao rápido crescimento das células cancerosas, que consomem nutrientes locais a uma alta taxa e induz a geração desregulada de vasos sanguíneos com endotélio descontínuo, que podem aumentar a penetração de nanopartículas circulantes no ambiente tumoral, enquanto a penetração em tecidos saudáveis ocorre pela barreira vascular intacta (SANTOS *et al.*, 2021; SIMELANE; ABRAHAMSE, 2021).

No direcionamento ativo, os nanocarreadores se acoplam a um ligante que apresenta receptores específicos na superfície das células tumorais, como anticorpos, proteínas, peptídeos, glicose e ácido fólico (XU *et al.*, 2015).

A interação ligante-receptor promove a seletividade pelas células tumorais e o acúmulo do fármaco no local de ação, reduzindo a toxicidade e aumento da disponibilidade do fármaco (TRAN *et al.*, 2017).

## 2.4 Fotossensibilizadores

Um dos constituintes de extrema importância para um bom resultado em tratamentos por TFD consiste na escolha de um FS ideal o qual precisa ser um composto fotoquímico não

tóxico, que ao ser administrado no paciente se acumule de maneira passiva ou ativa dentro de um tumor, a fim de que possa ser ativado com sucesso no comprimento de onda específico permitindo eficácia no tratamento.

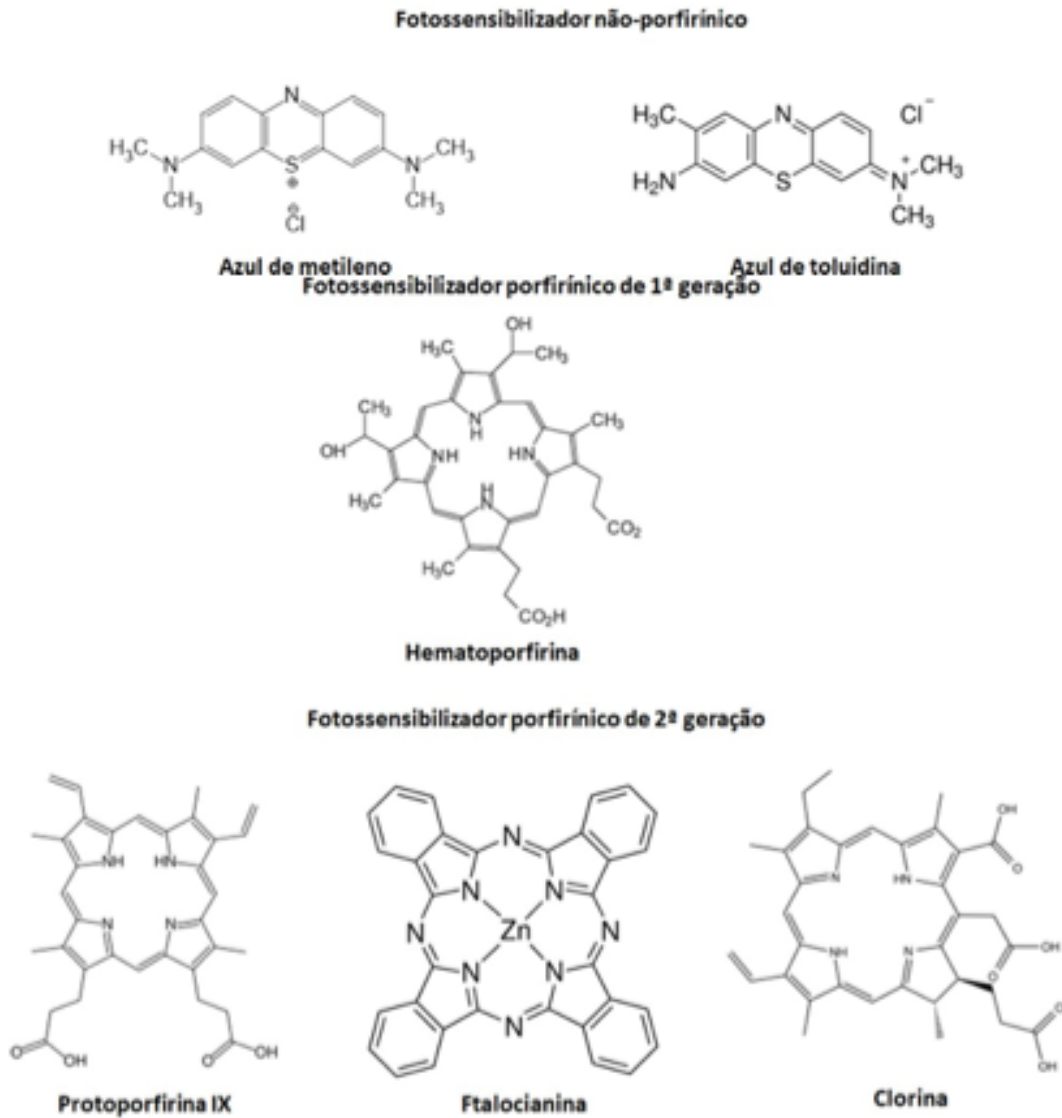
Os atuais FSs utilizados na terapia são compostos do tipo porfirínicos e não-porfirínicos, sendo o primeiro classificado em 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> gerações (Figura 6). Os compostos fotossensibilizadores derivados da HpD analisados anteriormente, apresentaram algumas desvantagens como: (CALIXTO *et al.*, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

- ✓ baixa absorção de luz dentro da janela terapêutica (600-800 nm);
- ✓ baixa seletividade tumoral;
- ✓ difícil purificação e isolamento de um único princípio ativo, devido ao fato de serem misturas de HpD.
- ✓ sintomas de fotossensibilidade cutânea prolongada.

Sendo assim, uma segunda geração de fotossensibilizadores foi desenvolvida para superar as limitações dos primeiros compostos. Entre os FSs de 2<sup>a</sup> geração estão os compostos de estruturas de porfirina, clorina e ftalocianina (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; SANTOS *et al.*, 2019). Os quais apresentam uma série de vantagens:

- ✓ alta absorção de luz nos comprimentos de onda de 600 a 800 nm, exatamente na janela terapêutica da TFD;
- ✓ baixa toxicidade *in vitro*;
- ✓ seletividade ao tecido alvo;
- ✓ bons geradores de oxigênio singleto;
- ✓ rápida eliminação do organismo.

Figura 6: Classificação dos fotossensibilizadores



Fonte: o Autor

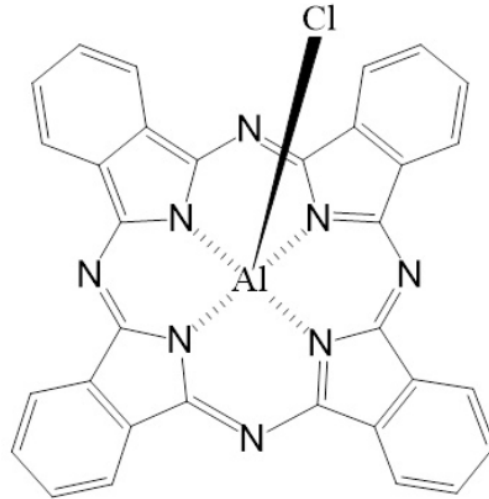
## 2.5 Ftalocianinas

A segunda geração de moléculas aplicadas em TFD se destacam devido as suas eficientes propriedades fotossensibilizadoras, como melhor atividade fotodinâmica e pureza química, em comparação aos de primeira geração. Além de apresentar elevados rendimentos quânticos prolongando o tempo de vida no estado singlete e tripleto (PY-DANIEL *et al.*, 2016).

Dentre as que merecem destaque, podemos citar a ftalocianina de cloro alumínio (ClAlPc) (Figura 7), que possui como átomo central o íon metálico alumínio, favorecendo a ação fotossensibilizadora do FS. A ClAlPc possui alto coeficiente de absorção molar na região vermelha do espectro (640-710 nm) permitindo uma maior penetração no sítio ativo após

exposição a uma fonte de luz, demonstrando boas propriedades para o tratamento de doenças pigmentadas (ABREU *et al.*, 2019; CARVALHO *et al.*, 2018).

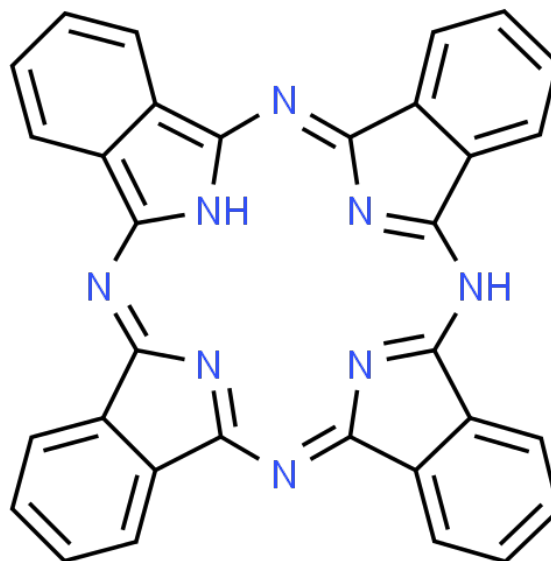
Figura 7: Estrutura da ftalocianina de cloro-alumínio



Fonte: Carvalho *et al* (2018).

Porém, compostos ftalocianínicos apresentam comportamento hidrofóbico devido a influência dos anéis presentes em sua estrutura planar (Figura 8), possuindo tendência de formar agregados em ambiente fisiológico, sendo necessário aplicar tecnologias nanocarreadoras, como DDS que funcionalizem o sistema de liberação de drogas para uso clínico, promovendo uma melhor dispersão em meio hidrofóbico, penetração na célula e absorção específica no tecido tumoral (PY-DANIEL *et al.*, 2016; GOTO *et al.*, 2017).

Figura 8: Estrutura base das ftalocianinas



Fonte: ChemSpider, 2022.

## 2.6 Sistema de Liberação Controlada de Fármacos

A nanotecnologia pode ser considerada uma estratégia para superar as limitações terapêuticas que são frequentemente encontradas nos tratamentos convencionais oncológicos. Através do desenvolvimento de sistemas de transporte a nível nanométrico, é possível otimizar a biodistribuição do princípio ativo, controlar sua velocidade de liberação, aumentar seu tempo de circulação na corrente sanguínea, disponibilizar o fármaco no local de ação e, assim, diminuir sua toxicidade, permitindo a administração de doses menores do fármaco e por conseguinte reduzir os efeitos colaterais sem deixar de promover o mesmo efeito terapêutico (KALYANE *et al.*, 2019; SAEEDI *et al.*, 2019; SIMOS *et al.*, 2020; WICKI *et al.*, 2015).

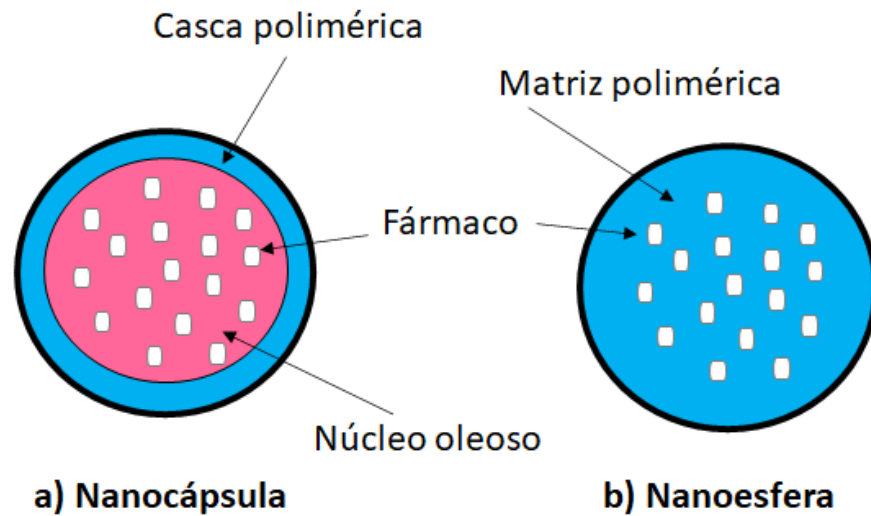
Para que os nanocarreadores permitam o direcionamento do fármaco nas células tumorais em detrimento das saudáveis preservando sua atividade, é necessário levar em consideração alguns aspectos quanto as características físico-químicas dos nanossistemas bem como estratégias de vetorização (DIANZANI *et al.*, 2014). Estratégias estas que compreendem as características do tumor, barreiras biológicas, biocompatibilidade e bioadesão (EL-KENAWY *et al.*, 2017; FRADE *et al.*, 2018).

Existem vários tipos de nanocarreadores que têm sido estudados como sistema de liberação de drogas como lipossomas, dendrímeros, micelas poliméricas e nanopartículas, com destaque para as nanopartículas poliméricas (ABREU *et al.*, 2019b).

As nanopartículas poliméricas (NPs) são sistemas construídos a partir de polímeros orgânicos ou inorgânicos e apresentam tamanho inferior a 1  $\mu\text{m}$ , além de apresentarem estabilidade termodinâmica em solvente aquoso. Porém, devido ao tempo de armazenamento, as nanopartículas podem se agregar, formando precipitados (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

Dependendo do método utilizado para sintetizar as NPs, estas podem se apresentar em dois tipos diferentes de organização: nanocápsulas e nanoesferas (BIZERRA; SILVA., 2016; RIGON *et al.*, 2015) (Figura 9).

Figura 9: Representação de uma nanoesfera e nanocápsula



Fonte: O Autor

As nanocápsulas constituem em sistemas no qual o FS encontra-se confinado em um núcleo definido (óleo ou água) e é envolto por uma camada polimérica. As nanoesferas, no entanto, possuem uma estrutura matricial polimérica onde o FS está disperso por toda a matriz do polímero. O fármaco pode estar adsorvido, dissolvido, disperso ou retido na matriz polimérica (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; RIGON *et al.*, 2015).

Utilizar polímeros biodegradáveis para o desenvolvimento de DDS apresenta uma série de vantagens como a não necessidade de uma segunda cirurgia para remoção do tumor, maior degradabilidade, biocompatibilidade, bioatividade e capacidade de reabsorção (MILOSEVIC *et al.*, 2020).

## 2.7 Nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL)

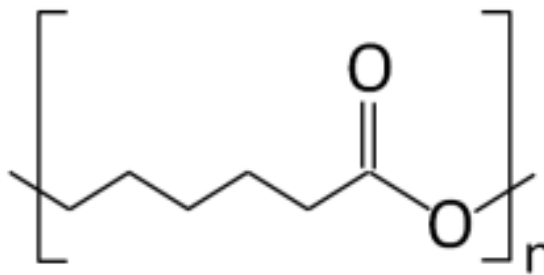
Vários estudos sugerem que as NPs em escala nanométrica devem possuir tamanhos de 10 nm a 1000 nm, a fim de proteger o FS contra ação enzimática, controlar a taxa de liberação de drogas e mantê-lo uniforme e constante dentro do local de ação, além de apresentar biocompatibilidade (CALIXTO *et al.*, 2016; COLMENARES-ROLDAN *et al.*, 2018).

Para fins medicinais, os tamanhos das NPs bem definidos são de grande importância, pois desempenham um papel crucial na mediação dos efeitos biológicos e do destino *in vivo* do sistema de distribuição de drogas. NPs com tamanho intermediário (10 – 200 nm) possuem

maior potencial para aplicações *in vivo*, dada sua capacidade de circulação na corrente sanguínea por longos períodos, bem como sua biodistribuição (SADASIVAM *et al.*, 2013).

Entre os biomateriais mais utilizados, existe a poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) (Figura 10), um polímero sintético comumente utilizado devido a sua biodegradabilidade e biocompatibilidade. Estudos apontam que utilizar PCL como sistema de liberação é mais vantajoso se comparado com o poli(ácido láctico) (PLA) ou poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA), devido a sua moderada taxa de liberação e maior tempo de degradação. Permitindo sua aplicação como matriz carregadora de substâncias ativas. Diversas são as técnicas utilizadas, até o momento, para a produção de nanopartículas de polímero tais como nanoprecipitação, emulsão-difusão, emulsão-coacervação, dupla emulsão, revestimento de polímero, fluidos supercríticos e deposição camada a camada, gelificação iônica entre outros (MILOSEVIC *et al.*, 2020; ANAYA; DIAS; THIRÉ, 2019; COLMENARES-ROLDAN *et al.*, 2018).

Figura 10: Estrutura molecular da poli- $\epsilon$ -caprolactona



Fonte: O Autor

Segundo Lino e colaboradores (2020) dentre as técnicas citadas, o método da nanoprecipitação é uma das mais simples e reprodutíveis. O método de nanoprecipitação, também conhecido como deslocamento de solvente, foi desenvolvido inicialmente por Fessi e colaboradores (WU, 2016). O princípio básico desta técnica é fundamentado na deposição interfacial de um polímero após o deslocamento do solvente orgânico de uma solução lipofílica para a fase aquosa. O polímero é dissolvido em um solvente miscível em água e esta solução é adicionada a uma solução aquosa gota a gota ou por taxa de adição controlada, mantida sob agitação (WU, 2016; GODARA *et al.*, 2020).

Existem várias vantagens da nanoprecipitação sobre outras técnicas de preparação de nanopartículas, como velocidade, custo, simplicidade, facilidade de escalabilidade, prevenção de entradas de alta energia, solventes tóxicos e surfactantes (ANSARI, 2017).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi desenvolver e caracterizar nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) com cloro-alumínio-ftalocianina (ClAlPc) encapsulada como um novo sistema de liberação controlada para fármacos baseado na técnica de nanoprecipitação para aplicação em fotoprocessos.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) pelo método de nanoprecipitação;
- Encapsular o fármaco fotossensibilizador ClAlPc na matriz polimérica;
- Determinar as propriedades fotofísicas e fotoquímicas do sistema nanoparticulado para aplicação em fotoprocessos.
- Estudar a liberação *in vitro* para a formulação desenvolvida.
- Avaliar a citotoxicidade e fototoxicidade *in vitro* do sistema nanoparticulado.
- Analisar a localização intracelular *in vitro* para as nanopartículas poliméricas.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos experimentais foram desenvolvidos nas instalações do Laboratório de Sistemas Micro e Nanoparticulados, localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D) na Universidade do Vale do Paraíba (Univap).

### 4.1 Materiais

Poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) doado pelo Instituto Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila (IGTPAN).

Tween 80 ou polissorbato 80 ( $C_{64}H_{124}O_{26}$ ), um surfactante não-iônico utilizado para emulsificar óleo em água, também adquirido da Sigma-Aldrich.

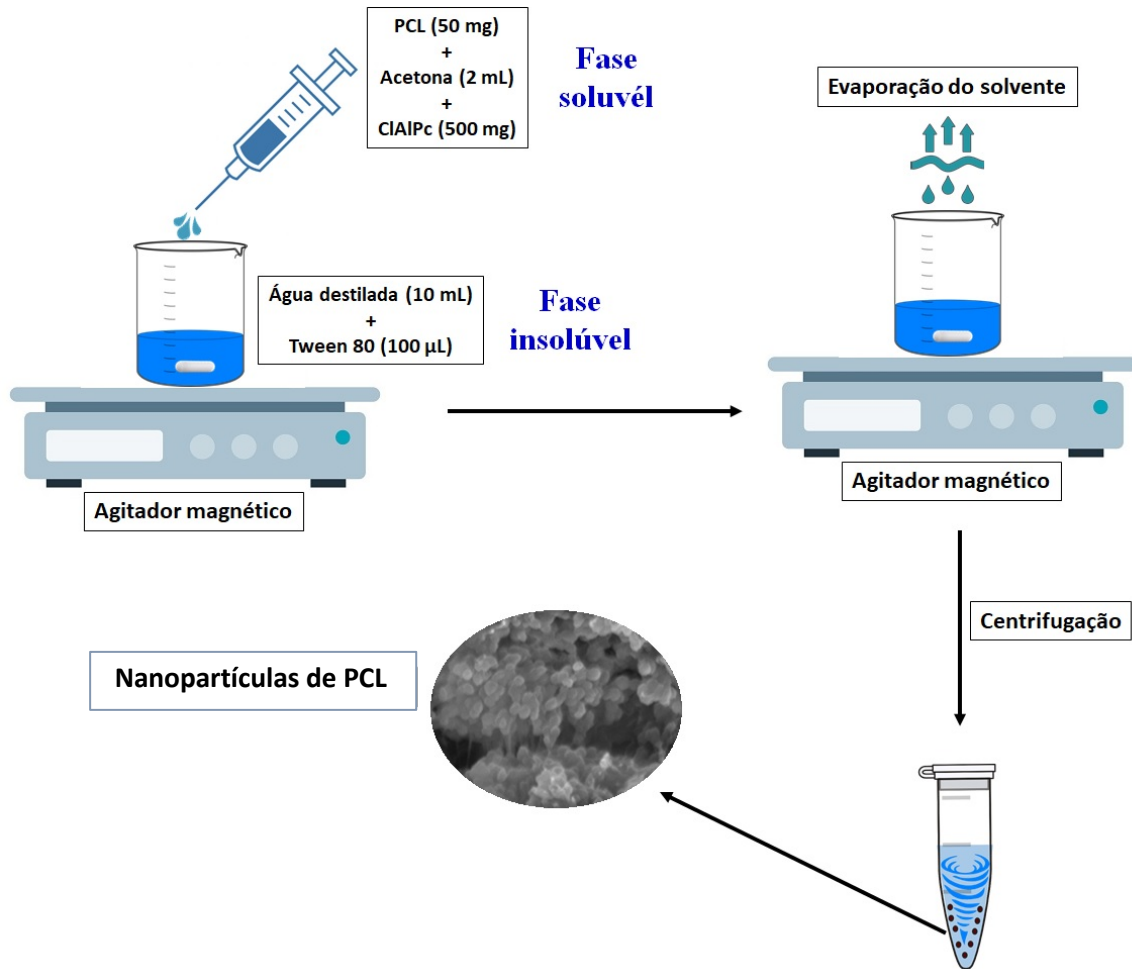
Ftalocianina de cloro alumínio foi adquirida da Acros Organics.

Dimetilsulfóxido (DMSO) e acetona foram adquiridos da Dinâmica, Química contemporânea Ltda.

### 4.2 Síntese de nanopartículas PCL

As nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) foram preparadas pelo método de nanoprecipitação, conforme mencionado em Lino e colaboradores (2020) e com adaptações baseadas em Schubert e colaboradores (2011) (Figura 11). O polímero poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) foi previamente pesado (50 mg) e solubilizado na acetona em banho ultrassônico, por aproximadamente 10 minutos. Após solubilização, os componentes da fase orgânica (FO), também conhecidos como fase solúvel, foram misturados lentamente (~ 10 minutos), com o auxílio de um agitador magnético. Em seguida, a solução orgânica obtida foi adicionada gota a gota na fase aquosa (FA – fase insolúvel) contendo o surfactante Tween 80, sob agitação moderada durante 30 minutos. A evaporação do solvente ocorreu *overnight*. Após este procedimento, a amostra foi encaminhada para três ciclos de centrifugação a 15000 rpm por 20 minutos e lavada com água destilada para remoção das impurezas. Posteriormente, a amostra é armazenada em um tubo tipo Falcon e mantida na geladeira, para futuras análises.

Figura 11: Esquema de síntese das nanopartículas de PCL-CIAIPc



Fonte: O Autor

A preparação da CIAIPc (dissolvida em solução alcoólica de DMSO na concentração de  $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) nas nanopartículas de PCL foi realizado com a inserção do fármaco na fase solúvel, seguindo a metodologia descrita acima.

### 4.3 Caracterização Morfológica

A morfologia externa das nanopartículas de PCL foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), em um equipamento EVO-MA10 (Zeiss, Alemanha). As amostras das nanopartículas livre e encapsuladas, foram estudadas utilizando um aparato operando em modo de detecção de elétrons secundários sob alto vácuo e condições de potencial aceleração de 20 kV. Para obter as imagens, uma gota da amostra foi gotejada sobre o *stub* e foi seca à temperatura ambiente durante a noite. Em seguida, uma fina camada de ouro foi

pulverizada sobre a superfície. Esta análise permitiu avaliar a morfologia das partículas e sua distribuição dentro das amostras.

#### **4.4 Espectroscopia de absorção UV-Vis**

As leituras foram feitas com o espectrofotômetro Cary 50 em temperatura ambiente, utilizando cubetas de quartzo. A análise dos dados permitiu a investigação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário da CIAIPc encapsulada na nanopartícula de PCL, e na ausência do sistema. Usando absorvância para várias concentrações de CIAIPc, em dimetilsulfóxido (DMSO) (10%), sendo este diluente utilizado como o branco na análise, construiu-se uma curva de calibração para estabelecer a linearidade do método proposto e avaliar a lei de Beer. Uma análise de regressão pelo método dos mínimos quadrados foi realizada para os dados.

#### **4.5 Determinação do tamanho por espalhamento dinâmico de luz (DLS)**

O diâmetro médio das nanopartículas e o índice de polidispersividade (PDI) foram determinados pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS) em um equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern). As amostras foram diluídas em água destilada (1:10) e medidas em um ângulo de dispersão de  $173^\circ$  à temperatura ambiente. Foram medidos em triplicata e considerados os valores médios. Os resultados foram processados utilizando o software Origin.

#### **4.6 Determinação do potencial zeta**

Para a determinação do potencial zeta, foi utilizado o equipamento Zetasizer (ZetaSizer Nano ZS90, Malvern). A partir dessa análise foi possível analisar a estabilidade das nanopartículas e sua interação com o fármaco encapsulado. Para determinar o valor do potencial zeta das amostras foram coletadas medidas em tempos distintos de armazenamento por 90 dias. As amostras foram diluídas em água destilada (1:10) e as medições foram realizadas em triplicata. Os resultados foram processados utilizando o software Origin.

#### 4.7 Rendimento do processo (%)

Para determinar o percentual de rendimento da síntese (Y), a amostra de pó de nanopartículas obtida foi pesada e o percentual de rendimento foi calculado usando a seguinte equação 1, conforme relatado na literatura (KOLLURU *et al.*,2013).

$$Y (\%) = \frac{(\text{peso das nanopartículas})}{(\text{peso de polímero e FS})} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

O método de encapsulamento foi realizado em triplicata.

#### 4.8 Eficiência de encapsulamento (EE)

A quantidade de fármaco encapsulado nas nanopartículas de PCL foi determinada a partir da quantidade de CIAIPc livre no sobrenadante após o processo de centrifugação, determinado por espectroscopia de absorção por UV-Vis em 674 nm, comprimento de onda de máxima absorção da CIAIPc. A eficiência de associação/encapsulamento de CIAIPc nas nanopartículas foi determinada a partir da seguinte equação (2):

$$EE (\%) = \left[ \frac{(\text{peso da CIAIPc total} - \text{peso da CIAIPc no sobrenadante})}{(\text{peso da CIAIPc total})} \right] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

#### 4.9 Avaliação do desempenho de liberação do fármaco *in vitro*

Para avaliar o desempenho de liberação, *in vitro*, do FS a partir de nanopartículas poliméricas de PCL, 5,0 mg foram dispersas em solução tampão fosfato (PBS) (5 mL, pH = 7,4) e agitadas a 37 °C. Em diferentes intervalos predeterminados, a suspensão foi centrifugada e o sobrenadante (3 mL) retirado e substituído por solução fresca de PBS (3 mL) para continuar a avaliação da liberação do medicamento. A concentração de CIAIPc no sobrenadante foi determinada pela absorbância UV-Vis a 674 nm, usando uma curva analítica da CIAIPc em solução alcoólica de DMSO 10%. Os dados estão relatados como média ± DP, com base em medidas triplicadas.

#### **4.10 Estudos espectroscópicos no infravermelho**

Os espectros de absorção no Infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 450  $\text{cm}^{-1}$  com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ , no modo transmissão, com 32 varreduras com temperatura controlada em 20 °C. O espectrofotômetro utilizado foi o Spectrum 400 com Transformada de Fourier (FT-IR), tecnologia de refletância total atenuada (ATR) da fabricante Perkin Elmer. Foram realizadas leituras das amostras de PCL puro, ClAlPc e híbrido PCL-ClAlPc para comparações posteriores

#### **4.11.A Culturas de células**

Células da linhagem Hela CCL-2, adenocarcinoma, foram cultivadas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) suplementado com 10% de FBS e 1% de Penicilina/Estreptomicina solução e mantida em estufa a 37 °C com 5% de  $\text{CO}_2$ .

#### **4.11.B Ensaio de citotoxicidade da nanoformulação**

Para avaliar o efeito citotóxico intrínseco das NPCL-ClAlPc, as células foram mantidas no escuro e incubadas com uma mistura de meio fresco e nanopartículas de PCL encapsuladas com o FS em concentrações finais de 0,6; 1,5; e 3,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  por 3 h. Após a incubação, o meio contendo a dispersão das nanopartículas foi descartado e as células lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS), seguida de re-incubação (5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C) em meio fresco por mais 24 horas, até a realização do ensaio de viabilidade celular descrito na Seção 4.12. As células de controle foram incubadas apenas com meio de cultura (células não tratadas) ou uma mistura do meio e nanopartículas não carregadas, ambas no escuro. Os experimentos de toxicidade em condições escuras foram realizados em triplicata, com oito poços para cada concentração de ClAlPc nanoencapsulado. Também foram testadas as mesmas concentrações de FS em sua forma livre, ou seja, quando não associado a um sistema de liberação.

#### 4.11.C Ensaio de fotocitotoxicidade da nanoformulação

Para avaliar o efeito fototóxico da ClAlPc nanoencapsulada em nanopartículas de PCL, as células de adenocarcinoma foram tratadas com meio contendo NPCL-ClAlPc a 0,6; 1,5; e 3,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C). Após 3 h de incubação, o meio carregado com ClAlPc nanoencapsulada foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS. As células foram expostas a doses de 10  $\text{J.cm}^{-2}$ . Após as irradiações, o meio incolor foi removido e as células incubadas novamente (5%  $\text{CO}_2$ , 37 °C) em meio fresco por 24 horas adicionais até que o ensaio de viabilidade celular por exclusão com azul de tripan fosse conduzido, conforme descrito na Seção 4.12. As células de controle foram incubadas apenas com o meio de cultura e sem irradiação leve (células não tratadas). O ensaio de fotocitotoxicidade foi realizado em triplicata, com oito poços para cada dose de luz. Também foram testadas as mesmas concentrações de FS em sua forma livre, ou seja, quando não associado a um sistema de liberação.

O dispositivo LED (Biopdi/IRRAD-LED 660 nm) utilizado nos experimentos de TFD é composto por 54 LEDs, sendo que cada LED apresenta potência de 70 mW, emitindo em  $660 \pm 5$  nm e cobrindo uma área de 150  $\text{cm}^2$ . A intensidade utilizada foi de 25  $\text{mW.cm}^{-2}$ , e o tempo de exposição foi de 6 min e 40 s, totalizando a densidade de energia de 10  $\text{J.cm}^{-2}$ .

Os grupos escuros foram mantidos no escuro e os grupos irradiados foram submetidos à exposição à luz LED.

#### 4.12 Ensaio de viabilidade pelo método de exclusão por azul de tripan

O teste de exclusão do azul de tripan é uma técnica usada para avaliar o número de células vivas e mortas após um determinado tratamento. Baseia-se fundamentalmente na capacidade (presente nas células vivas) de excretar o corante usado, enquanto as células mortas, devido à perda de sua propriedade seletiva de membrana, tendem a acumular o composto no ambiente intracelular.

Para este teste, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços a uma densidade de  $1 \times 10^4$  células por poço. Depois de 24h de adesão celular, o FS encapsulado foi adicionado nas concentrações escolhidas e incubado por 1h em um forno. Após esse período, o FS encapsulado foi removido, e meio completo fresco foi adicionado. Uma placa foi mantida

no escuro e a outra foi irradiada usando um dispositivo baseado em 48 LEDs, Biotable Irrad/LED660 (Biopdi), com irradiância de  $25 \text{ mW.cm}^{-2}$ , e uma fluência de  $10 \text{ J.cm}^{-2}$ , com comprimento de onda de 660 nm. A interação com o corante azul de tripan foi realizada 18h após a aplicação da TFD. Após esse período, o meio foi retirado dos poços e 50  $\mu\text{L}$  de solução de azul de tripan 0,2% foi adicionada e depois incubada por cinco minutos. Na sequência, a solução foi removida e PBS foi adicionado. Em seguida, os grupos foram avaliados contando o número de células vivas e mortas em 5 campos aleatórios para cada poço, por imagens obtidas usando o microscópio invertido (Zeiss Axio Vert A1).

#### **4.13 Internalização celular**

Para determinar a internalização do FS nas células foram transferidas  $1 \times 10^6$  células por poço, em placas de 24 poços com lamínulas redondas ao fundo, e incubadas em estufa à  $37^\circ\text{C}$  por 24 horas para aderir. Após esse período o meio de cultura foi retirado e o FS (livre e encapsulado) foi adicionado nas concentrações a serem testadas. Após uma hora de incubação em estufa o FS foi retirado, as amostras foram lavadas com PBS e em seguida foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de paraformaldeído 4% para a fixar as células.

Após a fixação as lâminas foram montadas com Prolong Gold antifading, contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, dihydrochloride) para marcação de DNA. As imagens foram capturadas no microscópio confocal LSM 700 Zeiss, UNIVAP (FINEP 01130275/00).

Para o marcador DAPI foi utilizada excitação em 358 nm e emissão captada em 461 nm, já para a Ftalocianina foi utilizado para excitação o laser de 488 nm e emissão captada acima de 500 nm.

#### **4.14 Análise estatística**

Todos os testes foram realizados em triplicata e todos os dados foram submetidos à ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. O Microsoft Excel foi usado para criar os gráficos de geração. Todos os dados são expressos como a média  $\pm$  DP de três experiências independentes. Um valor de probabilidade  $P < 0,05$  foi considerado significativo neste estudo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Síntese das nanopartículas de PCL

Os solventes utilizados para o processo de nanoprecipitação geralmente são escolhidos de acordo com a solubilidade do fármaco e o polímero em questão. Para drogas pouco solúveis como as ftalocianinas, solventes orgânicos como acetona, dimetilsulfóxido, etanol, acetato de etila entre outros podem ser considerados. Tem sido relatado na literatura que os solventes orgânicos devem ser miscíveis com água, pois facilitam o processo de difusão afetando assim o tamanho das nanopartículas (FESSI *et al.*, 1989; LEGRAND *et al.*, 2007).

O uso da acetona foi escolhido, pois segundo ANSAR e colaboradores (2017) solventes com alta difusão como a acetona favorece a formação de nanopartículas com tamanhos menores e com distribuição monomodal mais estreita. Também foi relatado que a afinidade do solvente para o não-solvente e as interações solvente-polímero desempenham papel muito importante na nanoprecipitação.

O Tween 80, também conhecido como polissorbato 80, é um surfactante não-iônico que tem a função de emulsificar óleo em água. Este surfactante foi utilizado na etapa de síntese, com o intuito de permitir a dissolução do polímero (PCL) em água, visto que este é hidrofóbico (GRIPPA *et al.*, 2020). Utilizar o tensoativo também é uma forma de aumentar a solubilidade de fármacos insolúveis em água, como é o caso da CIAIPc, e assim permitir a interação entre o fármaco e as nanopartículas de PCL (SILVA; VOLPATO, 2002).

Conforme descrito anteriormente, as nanopartículas de PCL foram preparadas segundo as metodologias relatadas no item 4.2 e após o processo de lavagem para remover as impurezas a amostra foi encaminhada aos processos de caracterização.

Imediatamente após adicionar a FO na fase aquosa, esta tornou-se opaca, indicando a formação das nanopartículas. Impulsionado por processos de difusão mútua do solvente e não solvente, o polímero perde sua solubilidade gradualmente e se separa na forma de partículas esféricas (CORDT *et al.*, 2020).

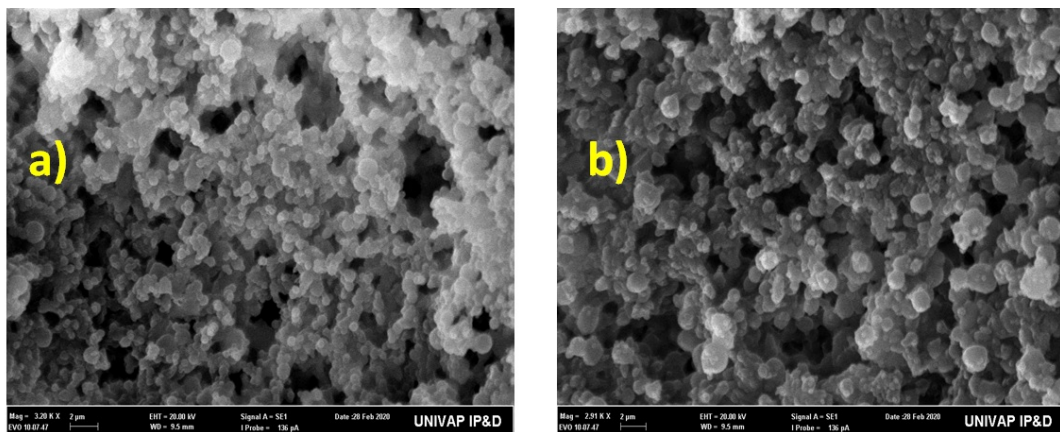
Em comparação com outros métodos de produção de partículas de polímero, como a polimerização em emulsão, a nanoprecipitação permite uma preparação de nanopartículas em uma etapa e com equipamento simples, sem a necessidade de agentes emulsificantes, solventes

tóxicos, como glutaraldeído, ou alto consumo de energia (CORDT *et al.*, 2020; QUÉRETTE; FLEURY; SINTES-ZYDOWICZ, 2019).

## 5.2 Caracterização Morfológica

A morfologia das nanopartículas de PCL-ClAlPc foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) como indicado na Figura 12. O tamanho de partícula é a característica mais importante dos sistemas de distribuição de fotossensíveis visto que, a distribuição do fotossensibilizador e a eficiência do direcionamento são afetadas pelo tamanho das partículas. A análise do MEV mostra claramente a formação de nanopartículas uniformes, de formato esférico, com superfície regular e lisa.

Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura: (a) nanopartículas de PCL; (b) nanopartículas de PCL com fotossensibilizador.



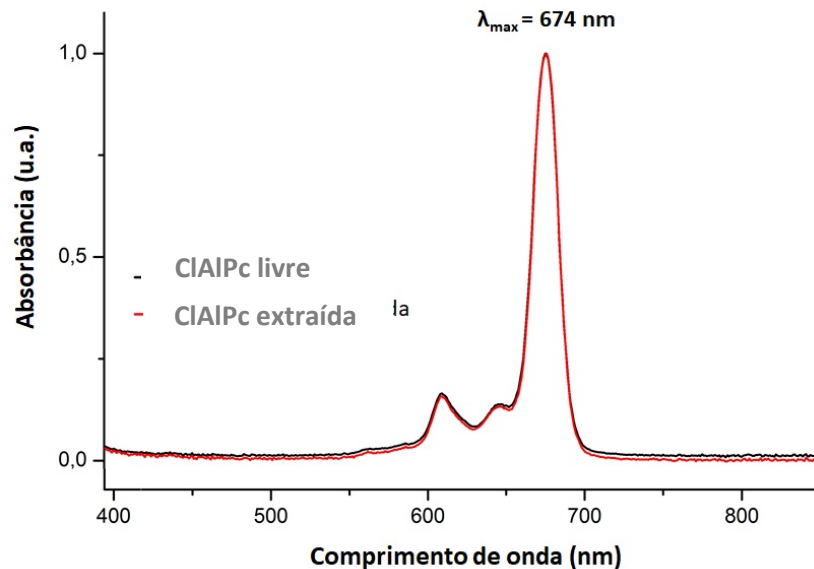
Fonte: O Autor

Este resultado corrobora com os estudos de Prabu e colaboradores (2008). Os autores sintetizaram nanopartículas de PCL carregadas com vinblastina como medicamento anticâncer. A formulação desenvolvida apresentou uniformidade moderada com distribuição de tamanho estreita.

### 5.3 Estudos espectroscópicos no estado estacionário

As nanopartículas foram inicialmente caracterizadas no estado estacionário por espectroscopia no ultravioleta-visível. O espectro de absorção do padrão ClAlPc (0,5  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e extraídos das nanopartículas de PCL em DMSO são ilustrados na Figura 13.

Figura 13: Espectros de absorção da ClAlPc (1  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ).



Fonte: O Autor

Os espectros UV-Vis da ClAlPc encapsulada exibiram características de absorção semelhantes a ClAlPc livre, exibindo uma forte absorbância na região vermelha, com um comprimento de onda máximo ( $\lambda_{\text{max}}$ ) em 674 nm (Figura 13). Esta banda de absorção permite que o fármaco seja absorvido na região onde há penetração máxima no tecido (600-800 nm, faixa conhecida como janela terapêutica), o que deve aumentar a eficiência do dano celular e a resposta do tumor ao fototratamento (CARVALHO *et al.*, 2018; CALIXTO *et al.*, 2016).

Nenhuma mudança da absorção máxima na banda Q pode ser observada, sugerindo que o fotossensibilizador estava principalmente na forma monomérica sem agregação dentro das nanopartículas. Isso indica que as propriedades fotofísicas das moléculas de ClAlPc nas nanopartículas foram mantidas (SOUZA *et al.*, 2020).

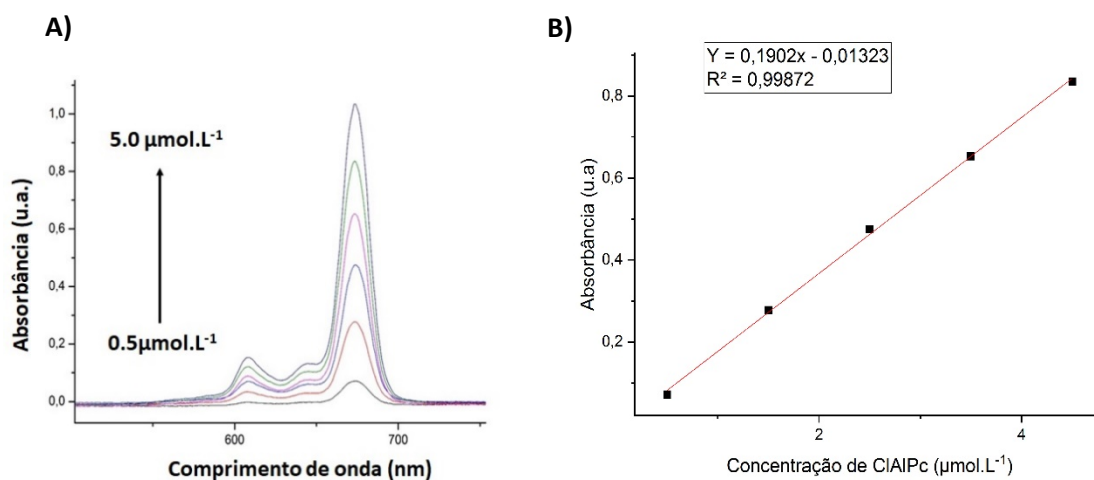
Lin e colaboradores (2021) a fim de melhorar a absorção e citotoxicidade das ftalocianinas, aumentar sua taxa de encapsulação e reduzir a agregação de ftalocianina em nanopartículas, co-carregou três componentes, curcumina, tetra-(4-bromotiofenol) ftalocianina

zinco (II)/magnésio (II) e nanopartículas de ouro para formar nanopartículas poliméricas usando poli(etilenoglicol)- $\beta$ -poli(caprolactona) como um nanocarreador. Os autores relatam que o espectro de absorção da banda Q das ftalocianinas encapsuladas em nanopartículas poliméricas apareceu em 696 nm, que foi desviado para o vermelho em aproximadamente 6 nm em comparação com a ftalocianina livre, indicando que o fotossensibilizador existia principalmente como um monômero nas nanopartículas.

As análises realizadas por espectroscopia de absorção no UV-Vis permitiram averiguar se ocorreram alterações no perfil espectral do composto bioativo quando veiculados ao sistema de encapsulamento, além da avaliação do comportamento da ClAlPc em diferentes concentrações, a partir da linearidade das concentrações do sistema proposto.

Para verificar a linearidade de um método analítico foram realizadas análises de correlação linear plotando a intensidade da absorbância *versus* a concentração do fármaco na faixa de  $0,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$  a  $5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ , como é possível observar na figura 14a.

Figura 14: a) Espectros de absorção de ClAlPc em diferentes concentrações ( $0,5 - 5,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ). (b) gráfico da concentração de ClAlPc vs. Absorbância.



Fonte: O Autor

A regressão de mínimos quadrados para o método espectrofotométrico mostrou um satisfatório coeficiente de correlação ( $R^2 = 0,99872$ ) e a equação da reta foi:  $Y = 0,1902x$ . [Concentração de ClAlPc,  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ] - 0,01323 (Figura 14B).

A eficiência de encapsulamento (EE) foi determinada pelo método espectrofotométrico com base na absorção na região do UV-Vis. A EE para a nanoformulação desenvolvida foi de  $80,8 \pm 0,52 \%$ . Snehalatha, Venugopal e Saha (2008) sintetizaram nanopartículas de PCL por nanoprecipitação para o encapsulamento de Etoposide, que é um medicamento estabelecido

para uso no tratamento de primeira linha de várias doenças malignas, como linfoma, leucemia, fígado câncer, câncer de pulmão (SNEHALATHA; VENUGOPAL; SAHA, 2008). Os autores relatam uma EE de  $80.15 \pm 1.01$ .

#### 5.4 Caracterização físico-química de nanopartículas de PCL-CIAIPc

A distribuição de tamanho da nanopartícula medida por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) também conhecida como espalhamento dinâmico de luz (DLS) é exibida na Figura 15.

É de suma importância controlar o tamanho das nanopartículas a fim de obter resultados melhores na taxa de liberação e encapsulamento dos compostos bioativos, visto que partículas menores são mais propensas de serem aplicadas em administração intravenosas (PAKULSKA *et al.*, 2016).

A partir das análises do DLS, verificou-se que as nanopartículas encapsuladas possuem um diâmetro hidrodinâmico médio (Z-Average) de volume de  $266,7 \pm 83,1$  nm e uma distribuição de tamanho monodispersa com índice de polidispersividade (PDI) = 0,105.

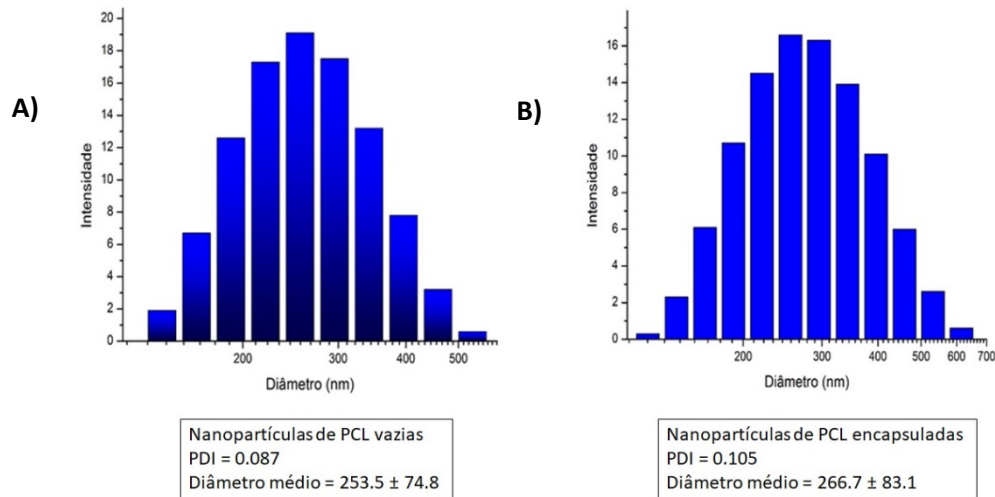
O índice de polidispersividade, que varia de 0 a 1, indica a uniformidade de tamanho das nanopartículas na suspensão de nanocápsulas; conforme esse valor se aproxima de 0, a distribuição de tamanho das nanocápsulas nas suspensões torna-se mais homogênea (LINO *et al.*, 2020). Portanto, a partir das medidas de DLS foi possível demonstrar um tamanho médio constante no intervalo de tempo com  $PDI < 0,3$  sendo considerado significativa neste estudo.

Ao comparar as medições do DLS com o MEV é possível observar que o raio hidrodinâmico determinado por DLS é maior que o tamanho de partícula verificado por MEV. É possível que o aumento do tamanho das partículas seja causado pela inserção de moléculas fotossensibilizadoras na superfície das nanopartículas de PCL que podem aumentar o diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas e, pelo fato de que a técnica de DLS leva em consideração o raio hidrodinâmico do sistema nanoparticulado, por isso houve o aumento do tamanho médio comparado com o MEV, que fornece uma faixa de tamanho mais estreita pois a amostra está seca.

Danafar (2017) avaliou a composição de nanopartículas de Policaprolactona/Poli (Etileno) como efeito do comprimento das cadeias hidrofílicas e hidrofóbicas dos copolímeros no encapsulamento da curcumina e relata que, após o encapsulamento, o tamanho das

nanopartículas aumentou. Este resultado era esperado, porque a incorporação de curcumina no núcleo hidrofóbico aumenta o volume das nanopartículas.

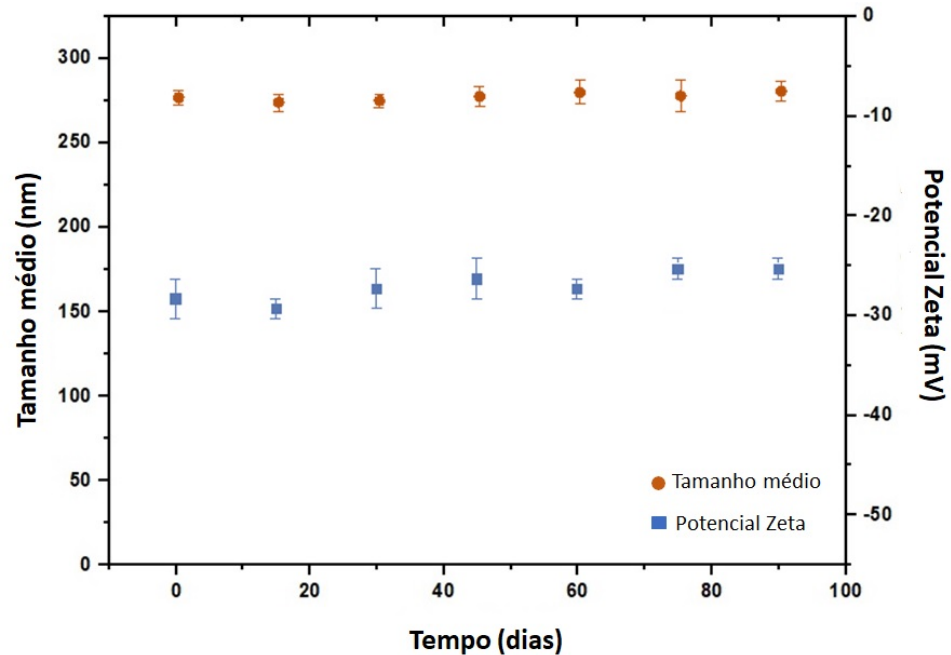
Figura 15: Distribuição de tamanho medido por DLS medido para o sistema nanoparticulado: (a) nanopartículas de PCL; (b) nanopartículas de PCL com fotossensibilizador.



Fonte: O Autor

A figura 16 mostra a evolução temporal do tamanho e do potencial zeta para nanopartículas de PCL-ClAlPc. As amostras foram mantidas no escuro. As análises foram realizadas em função do tempo por 90 dias em água ultra-pura.

Figura 16: Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de nanopartículas de PCL - ClAIPc monitorada durante 90 dias após a preparação.



Fonte: O Autor

O potencial zeta é um parâmetro físico-químico importante que influencia a estabilidade das nanossuspensões. Valores de potencial zeta extremamente positivos ou negativos causam forças repulsivas maiores, enquanto a repulsão entre partículas com carga elétrica semelhante impede a agregação das partículas e, portanto, garante uma redispersão fácil (HONARY; ZAHIR., 2013).

O resultado do potencial zeta mostrou que a nanocápsula exibe valor de potencial zeta negativo, sendo antes do carregamento  $-27,62 \pm 1,12$  mV e após o carregamento FS  $-28,31 \pm 1,25$  mV.

As cargas negativas podem ser atribuídas à natureza hidrofóbica do PCL, que pode causar a ionização dos grupos carboxílicos na superfície deste poliéster e resultar em um potencial negativo para a interface, corroborando o potencial zeta negativo determinado para todas as nanocápsulas preparadas independentemente do tipo de surfactante usado. Esses resultados são consistentes com estudos descritos na literatura, que argumentam que potenciais zeta negativos são tipicamente observados nos tipos de sistemas compostos por poliésteres (LINO *et al.*, 2020).

Kolluru e colaboradores (2020) descreveram o desenvolvimento e avaliação de formulação de nanopartículas de policaprolactona encapsuladas com docetaxel para terapia

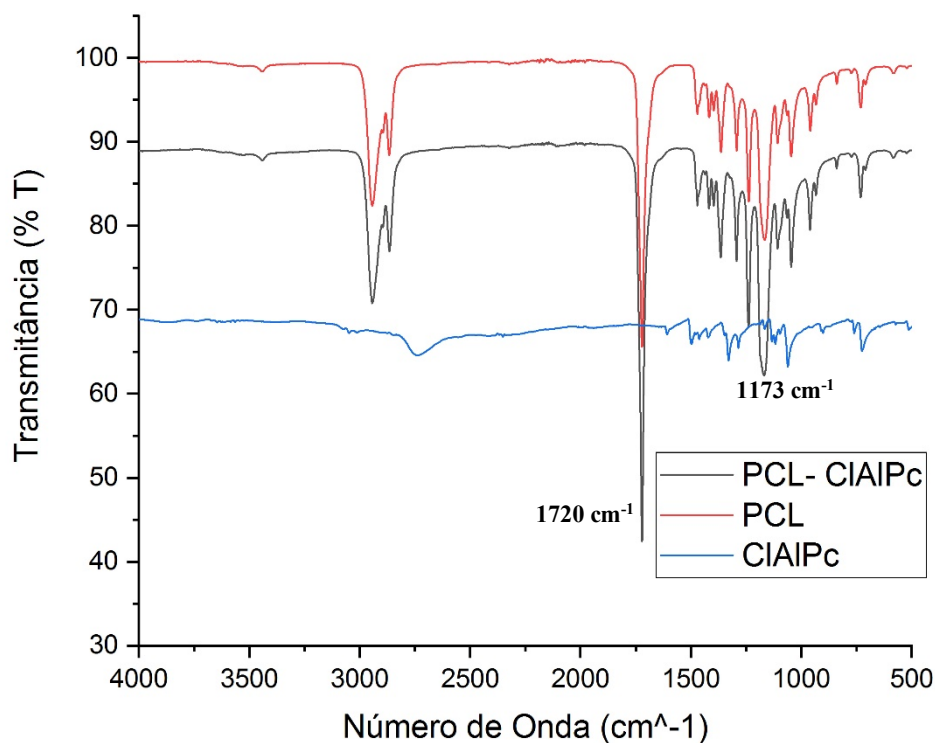
direcionada ao câncer de mama (KOLLURU *et al.*, 2020). A formulação otimizada de nanopartículas apresentou um tamanho de partícula de 100–300 nm, índice de polidispersidade de 0,156 e potencial zeta de  $-7,37 \text{ mV} \pm 4,93 \text{ mV}$ .

## 5.5 Análise FTIR

A análise FTIR (*Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) é um tipo de espectroscopia de absorção que evidencia diversos tipos de ligações químicas existentes na amostra devido a interação das moléculas ou átomos com a radiação, em determinados comprimentos de onda em um processo de vibração molecular (TORRES-RIVERO *et al.*, 2021).

Os espectros de FTIR do PCL puro, do fotossensibilizador e do híbrido PCL-CIAIPc são apresentados na figura 17.

Figura 17: Espectro FTIR para PCL puro, CIAIPc e híbrido PCL-CIAIPc.



Fonte: O Autor

A partir dos resultados obtidos é possível observar sinais de absorção característicos para o grupo carbonila ( $C = O$ ) em  $1720\text{ cm}^{-1}$  e o grupo éter ( $C - O - C$ ) em  $1173\text{ cm}^{-1}$ , para o polímero puro, corroborando com os estudos realizados por Rai *et al* (2016).

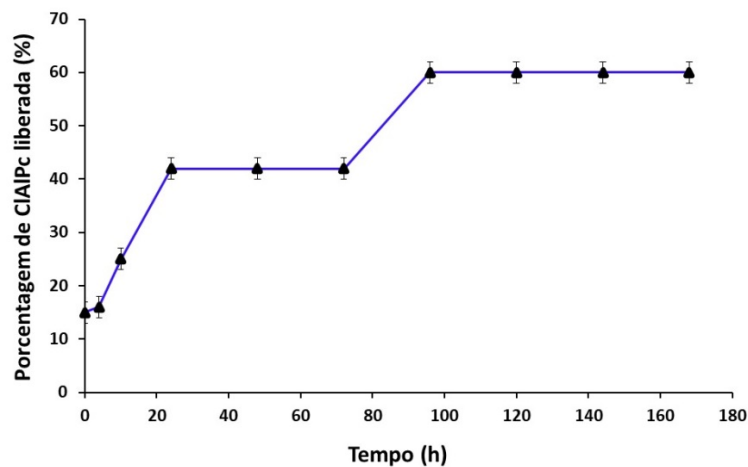
No espectro do fotossensibilizador (CIAIPc) livre observa-se bandas característicos para as seguintes ligações: Ligação  $C = C$  (na região dos  $1100\text{ cm}^{-1}$ ), ligação  $C - N - C$  (região de  $1300\text{ cm}^{-1}$ ) conforme descrito em Peres e colaboradores (2016).

No entanto, como a amostra de CIAIPc encapsulada utilizada para realizar a análise estava com uma concentração baixa do FS, os sinais de absorção no espectro FTIR da nanopartícula de PCL-CIAIPc se sobrepõem em grande parte do delineamento espectral, e por isso foram possivelmente mascarados.

## 5.6 Estudos de liberação *in vitro*

A liberação cumulativa de CIAIPc das nanopartículas de PCL está mostrado na Figura 18. Um padrão de liberação bifásica do fármaco foi evidenciado por uma liberação inicial dentro de 15 % da liberação de CIAIPc, o que aumentou gradualmente até 42% em 72 h. Após esta fase, uma liberação lenta da CIAIPc constante até 60% em até 168 h, mostrando uma liberação sustentada e prolongada típica do medicamento que depende da difusão do medicamento e dos mecanismos de erosão da matriz.

Figura 18: Perfil de liberação *in vitro* para a CIAIPc encapsulada em nanopartículas de PCL.



Fonte: O Autor

O *burst* inicial de liberação da CIAIPc está relacionado à dissolução imediata e liberação do FS adsorvido na superfície da nanopartícula, seguido da liberação sustentada para a CIAIPc presente no núcleo do polímero matriz. Durante o estudo, alíquotas das amostras foram coletadas em intervalos pré-determinados e a quantidade de CIAIPc foi quantificada. Os resultados foram expressos em termos de porcentagem de liberação. Durante o processo de liberação do fármaco, o fármaco se difunde através da matriz polimérica hidratada para a fase aquosa. O processo de hidratação relaxa as cadeias poliméricas e aumenta a difusão das moléculas do fármaco. A taxa de absorção de água (hidratação) de partículas de copolímero aumenta com a hidrofiliabilidade do polímero (KAMARAJ *et al.*, 2017). Esses resultados corroboraram com o estudo anterior relatado por de la Ossa e colaboradores (2012) em que 76-84% de liberação de canabinóides ocorreu no final do dia 7 a partir de microesferas de PCL (DE LA OSSA *et al.*, 2012).

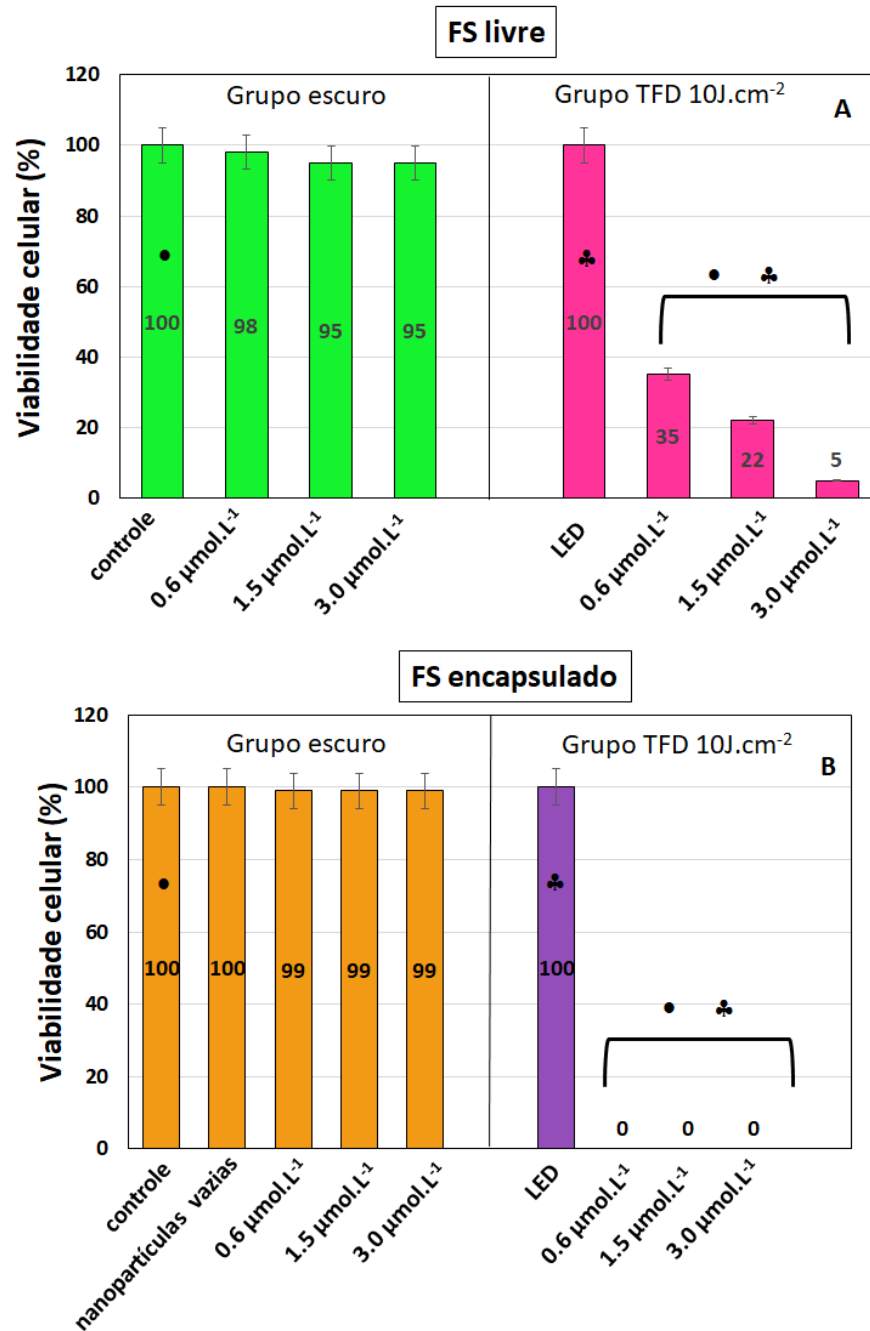
### **5.7 Teste de exclusão e viabilidade celular por azul de tripan**

Para uma nanoformulação bem-sucedida, é necessário caracterizar a nanoformulação e avaliar sua toxicidade para reduzir impactos negativos no sistema vivo. Para testar o efeito citotóxico da nanoformulação, as células de adenocarcinoma foram expostas a várias concentrações CIAIPc encapsulada em nanopartículas de PCL.

Testes de exclusão por azul de tripan é utilizado para determinar o número de células vivas e mortas. Esses ensaios são baseados no princípio de que membranas plasmáticas intactas em células vivas excluem corantes específicos, enquanto células mortas não (AVELAR-FREITAS *et al.*, 2014).

As células de adenocarcinoma foram tratadas com CIAIPc livre em várias concentrações para comparar a citotoxicidade do fármaco livre e na nanoformulação. Tanto o fármaco livre quanto o nano veiculado não alteraram a viabilidade celular como mostrado na Figura 19.

Figura 19: Análise da viabilidade da linhagem celular HeLa CCL-2: (A) FS livre; (B) FS encapsulado. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos: • em comparação com o controle no escuro; ♣ em comparação com o controle de luz. (ANOVA,  $p \leq 0,05$ ).



Fonte: O Autor

Portanto, o FS livre e encapsulado são considerados não tóxicos até uma concentração de 3  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Após o tratamento com nano-CIAIPc, a viabilidade celular de todas as células tratadas foi encontrada ser  $>95\%$ , indicando que a nano-CIAIPc e o CIAIPc livre foram consideradas não tóxicas em todas as concentrações testadas.

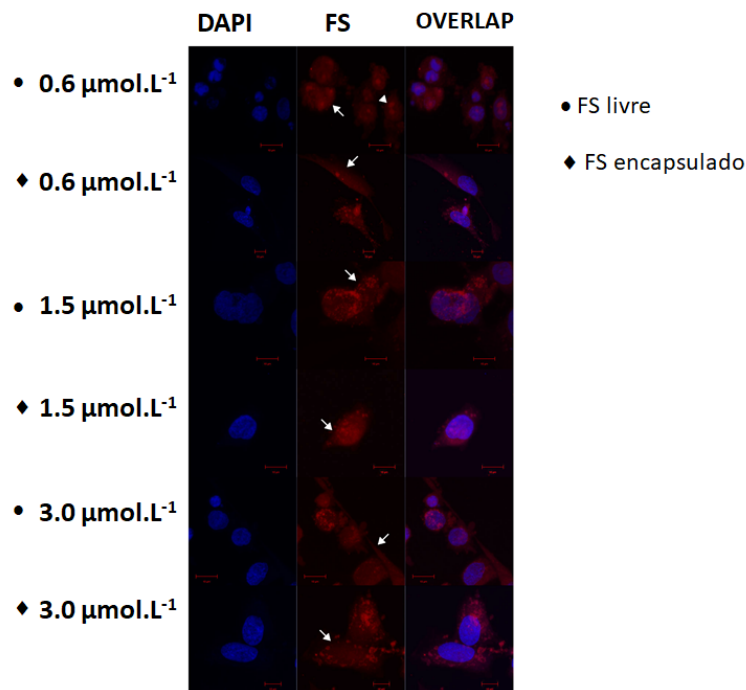
Após a fotoirradiação (grupo TFD), houve um aumento dependente da concentração de CIAIPc no efeito citotóxico, para ambas as amostras analisadas, ou seja, o fotossensibilizador na sua forma livre e quando veiculado na nanoformulação de PCL. Para a CIAIPc veiculada em nanopartículas de PCL, as três concentrações analisadas apresentaram morte celular de 100% quando submetidas aos protocolos de TFD.

Park e colaboradores (2019) desenvolveram nanoemulsão de PCL carregada com clorina-e6 para TFD. Os autores relatam que após irradiação por laser, a viabilidade celular de ambos os grupos (livre e encapsulado) diminuiu de uma maneira dependente da concentração de clorina e-6. Em baixa concentração, o FS veiculado em nanoemulsão de PCL mostrou morte de células tumorais aumentada por efeito fotodinâmico em comparação com FS livre (PARK *et al.*, 2019).

### **5.8 Internalização celular**

A microscopia confocal das células HeLa CCL-2 após 1 h de incubação com CIAIPc e CIAIPc-PCL foi realizada para sustentar a entrega no alvo e a absorção celular de PCL-CIAIPc (Figura 20).

Figura 20: Avaliação da localização celular do fotossensibilizador ClAlPc (• livre; ◆ encapsulados em nanopartículas de PCL) em células HeLa CCL-2 usando microscopia confocal. Fluorescência azul: DAPI (marcação nuclear); Fluorescência vermelha.



Fonte: O Autor

Este resultado demonstra que as nanopartículas podem entrar nas células por endocitose, liberando o fotossensibilizador no citoplasma celular.

A localização intracelular do fotossensibilizador, fator importante na TFD, pode induzir diferentes danos nas células (ANIOGO; GEORGE; ABRAHAMSE, 2021). Devido às suas características hidrofóbicas, a ClAlPc intracelular é capaz de se acumular no citoplasma e no núcleo.

Os resultados corroboram com o estudo de Soares e colaboradores (2011), que desenvolveram nanopartículas de PCL encapsuladas com zinco ftalocianina para aplicação *in vitro* em células A549 de adenocarcinoma de pulmão humano (SOARES *et al.*, 2011). Os autores demonstram que o FS é capaz de se acumular na membrana citoplasmática, no compartimento lisossomal e nas mitocôndrias.

Os resultados obtidos indicam que a ClAlPc carregado em nanopartículas de PCL podem efetivamente entregar um fotossensibilizador de 2ª geração em células de adenocarcinoma. Os resultados indicam um alto potencial da ClAlPc incorporada em nanopartículas poliméricas de PCL para o tratamento de cânceres, incluindo células de

adenocarcinoma. A baixa toxicidade da nanopartícula vazia pode assegurar um bom efeito terapêutico com menores efeitos colaterais na terapia *in vivo*.

## 6 CONCLUSÃO

A partir do que exposto foi possível observar que as nanopartículas de PCL-CIAlPc sintetizadas a partir do método de nanoprecipitação, utilizando acetona como solvente orgânico e tween 80 como surfactante apresentaram propriedades fotoquímicas e fotofísicas adequadas para um sistema de liberação de fármacos, com diâmetro hidrodinâmico de  $266,7 \pm 83,1$  nm e  $PDI = 0,105$ , com uma eficiência de encapsulamento elevada, com valor satisfatório de 81,8%, podendo ser utilizada de forma eficaz para a entrega aprimorada e direcionada de fármacos. A análise do MEV demonstrou que as nanopartículas possuem formato esférico, com superfície regular e lisa condizentes, o que facilita a circulação do fármaco no organismo e a sua internalização celular. Além disso, a formulação apresentou estabilidade física adequada, visto que não perde suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas ao ser incorporada na matriz polimérica, preservando a sua capacidade de causar danos no alvo do tratamento. A análise FTIR permitiu verificar as bandas características do PCL no sistema híbrido (PCL-CIAlPc), porém não foi possível verificar o aparecimento de novas bandas características da CIAlPc, devido a sua baixa concentração, no entanto isto não afetou a sua atividade fotodinâmica. Com o estudo de liberação do fármaco *in vitro* constatou-se que as nanopartículas de PCL carregadas com CIAlPc é eficiente para uma liberação sustentada e prolongada do medicamento. O experimento de citotoxicidade, demonstrou que o sistema nanoparticulado não foi tóxico para o sistema biológico utilizado, demonstrando biocompatibilidade do sistema desenvolvido. Ao avaliar a fototoxicidade do sistema, pode-se observar que após a fotoirradiação o efeito fotodinâmico do FS veiculado na nanopartícula de PCL maximizou a morte das células tumorais em comparação com o FS em sua forma livre. A análise da localização intracelular *in vitro* confirmou que as nanopartículas poliméricas são capazes de se acumular no citoplasma e no núcleo das células de adenocarcinoma utilizadas como modelo celular. Esses resultados reforçam a ideia de que nanopartículas de PCL são potencialmente eficazes e podem contribuir para o perfil de liberação sustentada em uma formulação promissora para TFD.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H; HAMBLIN, M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem. J.**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- ABREU, A. S. *et al.* Fabrication of polyelectrolyte microspheres using porous manganese carbonate as sacrificial template for drug delivery application. **Journal of Materials Research** 34, 1353–1362, 2019a.
- ABREU, A. S. *et al.* Synthesis, photophysical and photobiological characterization of BSA nanoparticles loaded with chloroaluminium phthalocyanine by one-step desolvation technique for photodynamic therapy action. **Journal of Biomaterials Science Polymer Edition**, v. 30, p.1-13, 2019b.
- ANAYA, M.J.M; DIAS, M.L; THIRÉ, R.M.S.M. Avaliação morfológica de fibras eletrofiadas de policaprolactona em função do tipo de solvente. **Revista Matéria**, v. 24, n. 3, 2019.
- ANIOGO, E.C.; GEORGE, B.P.; ABRAHAMSE, H. Molecular Effectors of Photodynamic Therapy-Mediated Resistance to Cancer Cells, **Int. J. Mol. Sci.**, n. 22, 2021.
- ANSARI, M. J. Factors Affecting Preparation and Properties of Nanoparticles by Nanoprecipitation Method, **Indo Am. J. P. Sci**, 2017.
- AVELAR-FREITAS, B.A. *et al.* Trypan blue exclusion assay by flow cytometry, Biomedical Sciences • **Braz J Med Biol Res**, v. 47, n. 4, 2014.
- BAPTISTA, M.S. *et a.* Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways. **Photochem Photobiol**, v. 93, p. 912-919, 2017.
- BERWIG, J.; ENGELMANN, W. As Nanotecnologias: das oportunidades a prevenção e precaução dos riscos. **SSRN Electronic Journal**, v.1, p. 39-74, 2017.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.
- BRYNS, A. K. *et al.* Nanotechnology-based strategies for combating toxicity and resistance in melanoma therapy. **Biotechnology Advances**, v. 34, n. 5, p. 565-577, 2016.
- CALIXTO, G. M. *et al.* Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.
- CARVALHO, J. A. *et al.* Preparation of gelatin nanoparticles by two step desolvation method for application in photodynamic therapy **J. Biomater. Sci. Polym.**, v. 29, n. 11, p. 1287–1301, 2018.
- CHEMSPIDER. **Phthalocyanine**. Disponível em: <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.4445497.html>. Acesso em: 2 fev. 2022.

- COLMENARES-ROLDAN, G. J. *et al.* Production of bioabsorbible nanoparticles of polycaprolactone by using a tubular recirculating system. **Revista Dyna**, v. 85, n. 204, p. 277-282, 2018.
- CORDT, C. *et al.* Entrapment of Hydrophobic Biocides into Cellulose Acetate Nanoparticles by Nanoprecipitation. **Nanomaterials**, v. 10, n. 12, 2020.
- DANAFAR, H. Study of the Composition of Polycaprolactone/Poly (Ethylene Glycol)/Polycaprolactone Copolymer and Drug-to-Polymer Ratio on Drug Loading Efficiency of Curcumin to Nanoparticles. **Jundishapur J Nat Pharm Prod.**, v. 12, n. 1, p. 34179, 2017.
- DE LA OSSA, D.H.P. *et al.* Poly- $\epsilon$ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. **J Control Release**, n. 161, p. 927–932, 2012.
- DIANZANI, C. *et al.* Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers. **BioMed Research International**, p. 1–13, 2014.
- EL-KENAWY, E. A. *et al.* Nanomedicine in Melanoma: current trends and future perspectives. **Cutaneous Melanoma: Etiology and Therapy**, v. 3, p. 143-159, 2017.
- FADEEL, D.A.; KAMEL, R.; FADEL, M. PEGylated lipid nanocarrier for enhancing photodynamic therapy of skin carcinoma using curcumin: in-vitro/in-vivo studies and histopathological examination. **Sci. Rep.**, v. 10, p. 10435, 2020.
- FESSI, H. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **Int. J. Pharm.**, v. 55, p. R1–R4, 1989.
- FRADE, M.L. *et al.* Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*. **Molecules**, v. 23, n. 473, p. 1-16, 2018.
- GODARA, S. *et al.* Lipid-PLGA hybrid nanoparticles of paclitaxel: preparation, characterization, in vitro and in vivo evaluation. **Materials Science And Engineering: C**, v. 109, n. 1, p. 110576, 2020.
- GOTO, P. L. *et al.* Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. **Int J Pharm.**, v. 518, n. 1-2, p. 228-241, 2017.
- GRIPPA, G.A. *et al.* Estudo genotóxico do surfactante Tween 80 em *Allium cepa*. **Revista Brasileira de Toxicologia**, v. 23, n. 1-2, p. 11-16, 2010.
- GUERRA, M.R.; GALLO, C. V. M; MENDONÇA, G. A. S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 51, n. 3, p. 227-234, 2005.
- HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 2, 2013.

HOSSEINZADEH, R.; KHORSANDI, K. Photodynamic effect of Zirconium phosphate biocompatible nano-bilayers containing methylene blue on cancer and normal cells. **Sci. Rep.**, v. 9, 14899, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

**Estimativa 2020:** Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **O que causa o câncer?** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/causas-e-prevencao/o-que-causa-cancer>. Acesso em: 28 dez. 2021b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Tipos de Câncer: Câncer de mama.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer-/cancer-de-mama>. Acesso em: 28 dez. 2021a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

**Tratamento do Câncer.** Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tratamento/cirurgia>. Acesso em: 28 dez. 2021c.

ISSA, M.C.A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **An Bras Dermatol.**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.

KALYANE, D. *et al.* Employment of enhanced permeability and retention effect (EPR): Nanoparticle-based precision tools for targeting of therapeutic and diagnostic agent in cancer. **Materials Science and Engineering C**, v. 98, p. 1252–1276, 2019.

KAMARAJ, N. *et al.* Fabrication, characterization, in vitro drug release and glucose uptake activity of 14-deoxy, 11, 12-didehydroandrographolide loaded polycaprolactone nanoparticles, **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 4, p. 353-362, 2017.

KOLLURU, L. P. *et al.* Formulation development of albumin based theragnostic nanoparticles as a potential delivery system for tumor targeting. **J. Drug Target**, v. 21, n. 1, p. 77-86, 2013.

KOLLURU, L.P. *et al.* Development and evaluation of polycaprolactone based docetaxel nanoparticle formulation for targeted breast cancer therapy, **J Nanopart Res**, v. 22, n. 12, 2020.

KOU, J.; DOU, D.; YANG, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. **Oncotarget.**, v. 8, p. 81591-81603, 2017.

LEGRAND, P. *et al.* Influence of polymer behaviour in organic solution on the production of polylactide nanoparticles by nanoprecipitation. **Int J Pharm**, v. 344, p. 33-43, 2007.

LI, Y.; KUMACHEVA, E. Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. **Sci. Adv.**, v. 4, 2018.

LIN, X. *et al.* Three components encapsulated nanoparticles: Preparation and photophysical property, **Arabian Journal of Chemistry**, v. 14, n. 3, p. 103023-103032, 2021.

- LINO, R.C. *et al.* Development and Characterization of Poly- $\epsilon$ -caprolactone Nanocapsules Containing  $\beta$ -carotene Using the Nanoprecipitation Method and Optimized by Response Surface Methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 2020.
- MILOSEVIC, M. *et al.* Preparation and modeling of three-layered PCL/PLGA/PCL fibrous scaffolds for prolonged drug release. **Sci Rep**, v. 10, 2020.
- OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Rev. Virtual Quim.**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015.
- PAKULSKA, M. M. *et al.* Encapsulation-free controlled release: Electrostatic adsorption eliminates the need for protein encapsulation in PLGA nanoparticles. **Sci. Adv.**, v. 2, n. 5, p. 1-10, 2016.
- PARK, C. *et al.* Chlorin e6-Loaded PEG-PCL Nanoemulsion for Photodynamic Therapy and In Vivo Drug Delivery, **Int. J. Mol. Sci.**, v. 20, 2019.
- PERES, M.F.S. *et al.* Bacterial Cellulose Membranes as a Potential Drug Delivery System for Photodynamic Therapy of Skin Cancer. **J.Braz.Chem.Soc.**, v. 27, n. 11, p. 1949-1959, 2016.
- PRABU, P. *et al.* Preparation, characterization, in-vitro drug release and cellular uptake of poly(caprolactone) grafted dextran copolymeric nanoparticles loaded with anticancer drug, **Journal of Biomedical Materials Research Part A**, p. 1128-1136, 2008.
- PY-DANIEL, K. R. *et al.* Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 103, p. 23–31, 2016.
- QUÉRETTE, T.; FLEURY, E.; SINTES-ZYDOWICZ, N. Non-isocyanate polyurethane nanoparticles prepared by nanoprecipitation. **European Polymer Journal**, v.114, p. 434–445, 2019.
- RAI, A. *et al.* Biodegradable Poly( $\epsilon$ -Caprolactone) as a Controlled Drug Delivery Vehicle of Vancomycin for the Treatment of MRSA Infection. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 30, p. 5151–60, 2016.
- RIGON, R.B. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for melanoma antitumoral therapy: A Review. **BioMed Research International**, p. 16-20, 2015.
- SADASIVAM, M. *et al.* Self-assembled liposomal nanoparticles in photodynamic therapy. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 115-129, 2013.
- SAEEDI, M. *et al.* Applications of nanotechnology in drug delivery to the central nervous system. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 111, p. 666–675, 2019.
- SANTOS, A. F. *et al.* Photodynamic therapy in cancer treatment - an update review. **J Cancer Metastasis Treat**, v. 5, n. 25, p. 1-20, 2019.

SANTOS, A. F. *et al.* Nanophotosensitizers for Cancer Therapy: A Promising Technology?. **J. Phys. Mater.**, v. 4, n. 3, 2021.

SCHAFFAZICK, S.R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Quim. Nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SCHUBERT, S. *et al.* Nanoprecipitation and nanoformulation of polymers from history to powerful possibilities beyond poly(lactic acid). **Soft Matter**, v. 7, p. 1581–1588, 2011.

SILVA, E.P.O. *et al.* Photodynamic effects of zinc phthalocyanines on intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis* and *Leishmania braziliensis*. **Lasers Med Sci.**, v. 30, p. 347-354, 2015.

SILVA, R.L; VOLPATO, N.M. Meios para dissolução de comprimidos de nimesulida: ação dos tensoativos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 2, 2002.

SIMELANE, N. W. N; CHERIE, A. K.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic diagnosis and photodynamic therapy of colorectal cancer in vitro and in vivo. **RSC Adv.**, v. 10, p. 41560–41576, 2020.

SIMELANE, N.W.N; ABRAHAMSE, H. Nanoparticle-Mediated Delivery Systems in Photodynamic Therapy of Colorectal Cancer. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 22, n. 22, 2021.

SIMOS, Y. V. *et al.* Trends of nanotechnology in type 2 diabetes mellitus treatment. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 1, p. 62-76, 2020.

SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química nova**, v. 25, p.801-807, 2002.

SINGH, M.S. *et al.* MDR in cancer: Addressing the underlying cellular alterations with the use of nanocarriers. **Pharmacological Research**, v. 126, p. 2–30, 2017.

SNEHALATHA, M; VENUGOPAL, K; SAHA, R N. Etoposide-Loaded PLGA and PCL Nanoparticles I: preparation and effect of formulation variables. **Drug Delivery**, v. 15, n. 5, p. 267-275, 2008.

SOARES, M.V. *et al.* Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells, **International Journal of Nanomedicine**, n. 6, p. 227–238, 2011.

SOUZA, E. F. *et al.* Vaterite submicron particles designed for photodynamic therapy in cells. **Photodiagnosis And Photodynamic Therapy**, v. 31, 2020.

TORRES-RIVERO, K. *et al.* Metal and metal oxide nanoparticles: An integrated perspective of the green synthesis methods by natural products and waste valorization: applications and challenges. **Comprehensive Analytical Chemistry**, v. 94, p. 433–469, 2021.

- TRAN, S. *et al.* Cancer nanomedicine: a review of recente success in drud delivery. **Clinical an Translational Medicine**, v. 6, n. 1, 2017.
- UCHOA, A.F.; BAPTISTA, M.S. Terapia fotodinâmica: mecanismos e perspectivas de desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, **Jornal Brasileiro de Laser**, p. 10-23, 2007.
- WAN, M.T.; LIN, J.Y. Current evidence and applications of photodynamic therapy in dermatology. **Clin. Cosmet. Investig. Dermatol.**, v. 7, p. 145-163, 2014.
- WICKI, A. *et al.* Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, p. 138–157, 2015.
- WU, X. Y. Strategies for optimizing polymer-lipid hybrid nanoparticle-mediated drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 13, n. 5, p. 609–612, 2016.
- XU, X. *et al.* Cancer Nanomedicine: From Targeted Delivery to Combination Therapy”. **Trends in Molecular Medicine**, v. 21, n. 4, p. 223–32, 2015.
- YOON, I.; LI, J. Z.; SHI, Y.K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clin. Endosc**, v. 46, p. 7-23, 2013.
- ZAZO, H.; COLINO, C.I.; LANAO, J.M. Current Applications of Nanoparticles in Infectious Diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 224, p. 86-102, 2016.
- ZHOU, L. *et al.* A Cu<sub>9</sub>S<sub>5</sub> nanoparticle-based CpG delivery system for synergistic photothermal-, photodynamic- and immunotherapy. **Commu. Biol.**, v. 3, n. 343, 2020.