

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA  
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

BENEDITO MARCIO DE OLIVEIRA JUNIOR

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) POR DUPLA  
EMULSIFICAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM FOTOPROCESSOS**

São José dos Campos

2021

BENEDITO MARCIO DE OLIVEIRA JUNIOR

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE POLI POLILÁCTICO (PLA) POR DUPLA  
EMULSIFICAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM FOTOPROCESSOS**

Dissertação de Mestrado apresentada no Programa de PósGraduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de concentração: Engenharias IV.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Andreza Ribeiro Simioni.

Coorientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Juliana Ferreira Strixino.

## FICHA CATALOGRÁFICA



### TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

#### Ficha catalográfica

OLIVEIRA, BENEDITO MARCIO DE OLIVEIRA JUNIOR  
SÍNTESE DE NANORPARTÍCULA DE ÁCIDO POLILÁCTICO (PLA) POR  
DUPLA EMULSIFICAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM FOTOPROCESSOS / BENEDITO  
MARCIO DE OLIVEIRA JUNIOR. OLIVEIRA; orientadora, Profa Dra  
Andreza Ribeiro Simioni Simioni; co-orientadora Profa Dra Juliana  
Ferreira Strixino STRIXINO. - São José dos Campos, SP, 2021.  
50 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do  
Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em  
Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. fotossensibilizador. 3.  
nanopartículas; polímeros. 4. terapia fotodinâmica. I. Simioni,  
Profa Dra Andreza Ribeiro Simioni, orient. II. STRIXINO, Profa  
Dra Juliana Ferreira Strixino, co-orient. III. Universidade do  
Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia  
Biomédica. IV. Título.

Eu, BENEDITO MARCIO DE OLIVEIRA JUNIOR OLIVEIRA, 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, 22 de Março de 2021.

  
Autor(a) da Obra



Data da defesa: 05 / 04 / 2021

## **ERRATA: MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.10. Análise de viabilidade celular através do método de exclusão de Azul de Tripan**

O ensaio de exclusão por Azul de Tripan é um método utilizado para avaliar a citotoxicidade e a fototoxicidade no qual é mensurando a viabilidade celular pela integridade da membrana celular. Baseia-se no fato que as células mortas absorvem o Azul de Tripan para seu citoplasma por perda de seletividade da membrana. Para a avaliação da viabilidade foi utilizado o método de exclusão por Azul de Tripan. Esse teste permite separar células vivas de mortas, pois células viáveis não permitem a entrada do corante, já as células mortas ficam coradas em azul e as incolores vivas. Trata se de um método eficaz, pois o método é barato e o rompimento da membrana plasmática é um fato que determina a morte celular. Após os ensaios de cito e fototoxicidade, após um período de 24 horas, o meio foi retirado e adicionado o Azul de Tripan na concentração de 0,2%, e incubado por 5 minutos. Após esse período, o Tripan foi retirado e foi adicionado PBS, e os grupos foram analisados em microscópio invertido, onde foram capturadas imagens das células. Para cada grupo foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios. As células vivas e mortas foram analisadas utilizando o software ImageJ.

---

**BENEDITO MARCIO DE OLIVEIRA JUNIOR**

**“SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) POR DUPLA  
EMULSIFICAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM FOTOPROCESSOS”.**

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

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> MARICILIA SILVA COSTA

*Maricilia Costa*

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> ANDREZA RIBEIRO SIMIONI

*Asimioni*

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> JULIANA FERREIRA STRIXINO

*Juliana Strixino*

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> LÚCIA VIEIRA

*Lúcia Vieira*

PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> ANDREA SANTOS LIU – IFSP

*Liu*

Prof.<sup>ª</sup> Dr.<sup>ª</sup> Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 05 de abril de 2021.

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por estar em minha vida em todo momento, me guiando, por ter me dado força para enfrentar todas as dificuldades que apareceram nessa caminhada de aprendizado.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Benedito e Mirair, que dentro das suas limitações me criaram e me orientaram.

Agradeço à minha esposa, Monica, minha companheira, melhor amiga, que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, que não me deixou desistir na dificuldade, que entendeu todos os meus momentos de estresse, que ficou ao meu lado sempre.

Aos meus filhos. Ingryd e Francisco Bento, que são minhas inspirações para lutar dia a dia e me dão força para ser uma pessoa melhor a cada dia.

À minha orientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Andreza, e à coorientadora, Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Juliana, pela paciência, dedicação, aprendizado e orientação em me auxiliar no desenvolvimento desta dissertação.

À Coordenação e aos professores do Programa de Mestrado, pela disposição e atenção em compartilhar os ensinamentos.

Sou muito grato a todos os envolvidos nesse trabalho, em especial, à equipe do Laboratório de Sistemas Micro e Nanoparticulados do IP&D.

## RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é proposta como um procedimento terapêutico promissor minimamente invasivo que emprega três elementos essenciais para induzir a morte celular: um fotossensibilizador, luz de um comprimento de onda específico e oxigênio molecular. Os fotossensibilizadores clássicos usados no protocolo de TFD apresentam algumas desvantagens que limitam sua aplicação clínica, como a baixa solubilidade em meio aquoso. O uso da nanotecnologia tem sido considerado, uma vez que fornece muitas ferramentas que podem ser aplicadas à TFD para contornar essas limitações e trazer novas perspectivas para a aplicação desta terapia para diferentes tipos de doenças. Neste trabalho, nanopartículas de poli (ácido lático) (PLA) foram desenvolvidas para encapsular a zinco ftalocianina (ZnPc), um fotossensibilizador hidrofóbico, utilizado em TFD. O método de emulsificação dupla foi aplicado para produzir nanopartículas de NPLA-ZnPc que foram caracterizadas por medidas de estado estacionário, tamanho de partícula, potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz, morfologia, eficiência de carregamento e liberação de fármaco. Na sequência, estudos *in vitro* foram realizados com e sem luz, conforme descrito pelos protocolos de TFD, utilizando células de gliossarcoma (9 L/LacZ) como modelo biológico, para avaliar o fotodano do fotossensibilizador quando incorporado na formulação polimérica. O tamanho médio das nanopartículas apresentadas foi de  $384,7 \pm 84,2$  nm, com índice de polidispersidade (PDI) de  $0,150 \pm 0,015$  nm, e a eficiência de encapsulação foi de 83%. As formulações de nanopartículas apresentaram valores de potencial zeta negativos ( $-27,5 \pm 1,0$  mV), explicando sua estabilidade coloidal. Os parâmetros fotofísicos característicos foram analisados: o perfil do espectro de absorção mostra que o fotossensibilizador carregado nas nanopartículas não sofre alteração em suas propriedades fotofísicas após o processo de encapsulamento. Um perfil de liberação sustentada ao longo de 168 h foi obtido, com um perfil de liberação de ZnPc bifásico. Um efeito fototóxico *in vitro* na faixa de 80% foi observado em células de gliossarcoma 9 L/LacZ em doses de luz laser ( $10 \text{ J.cm}^{-2}$ ) com  $3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ZnPc. A ZnPc carregada nas nanopartículas poliméricas apresentou estabilidade física adequada, boas propriedades fotofísicas, perfil de liberação sustentada e atividade *in vitro* adequada para ser considerada uma formulação promissora para TFD. Com base nos resultados obtidos, é esperado que a utilização de nanopartículas de PLA encapsuladas com ZnPc possa ser um adjuvante promissor no tratamento de neoplasias baseadas na aplicação de protocolos utilizando TFD, sendo que este modelo de sistema de liberação para aplicações em TFD visa contribuir para o aprimoramento tecnológico e científico do país em área inovadora e com potencial elevado de impacto social.

**Palavras-chave:** Fotossensibilizador. Nanopartículas. Poli (ácido lático). Terapia Fotodinâmica.

# SYNTHESIS OF POLYLACTIC ACID NANOPARTICLES (PLA) BY DOUBLE EMULSIFICATION FOR PHOTOPROCESS APPLICATION

## ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) has been proposed as a promising minimally invasive therapeutic procedure that employs three essential elements to induce cell death: a photosensitizer, light of a specific wavelength, and molecular oxygen. The classical photosensitizers used in PDT protocol has shown some drawbacks that limit its clinical application such as low solubility in aqueous medium. The use of nanotechnology has been considered since it provides many tools that can be applied to PDT to circumvent these limitations and bring new perspectives for the application of this therapy for different types of diseases. In this work, nanoparticles of poly (lactic acid) (PLA) were developed to encapsulate zinc phthalocyanine (ZnPc), a hydrophobic photosensitizer used in PDT. A double emulsification method was applied to produce NPLA-ZnPc nanoparticles which were characterized for steady state measurements, particle size, zeta potential, dynamic light scattering, morphology, loading efficiency and drug release. In sequence, *in vitro* studies were performed with and without light, as described by the PDT, protocols using gliosarcoma cells (9 L/LacZ) as a biological model, to evaluate the photodamage of the photosensitizer when incorporated in polymeric formulation. The mean nanoparticle size presented particle size was  $384.7 \pm 84.2$ , nm with polydispersity index (PDI) of  $0.150 \pm 0.015$  nm, and the encapsulation efficiency was of 83%. The nanoparticle formulations presented negative zeta potential values ( $- 27.5 \pm 1.0$  mV), explaining their colloidal stability. The characteristic photophysical parameters were analyzed: the absorption spectrum profile show that the photosensitizer loaded in nanoparticles does not suffer changing in its photophysical properties after the encapsulation process. A sustained release profile over 168 h was obtained with a biphasic ZnPc release profile. An *in vitro* phototoxic effect in range of 80% was observed in 9 L/LacZ gliosarcoma cells at laser light doses ( $10 \text{ J.cm}^{-2}$ ) with  $3.0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  of ZnPc. The ZnPc loaded within polymeric nanoparticles presented suitable physical stability, good photophysical properties, sustained released profile and suitable activity *in vitro* to be considered a promising formulation for PDT. Based on the results obtained, it is expected that the use of PLA nanoparticles encapsulated with ZnPc can be a promising adjuvant in the treatment of neoplasms based on the application of protocols using TFD, and this model of delivery system for applications in TFD aims to contribute to the technological and scientific improvement of the country in an innovative area with a high potential for social impact.

**Keywords:** Photosensitizer. Nanoparticles. Poly (lactic acid). Photodynamic therapy.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cinética de reação de fotossensibilização levando a TFD (tipos I e II). .....	18
Figura 2 - Estrutura química de alguns fotossensibilizadores de segunda geração.....	20
Figura 3 - Estrutura química do fotossensibilizador zinco ftalocianina (ZnPc).....	21
Figura 4 - ZnPc encapsulada em nanopartículas de PLA preparadas pela técnica de dupla emulsão (A1/O/A2). .....	26
Figura 5 - Formulação de nanopartículas de PLA sintetizadas via dupla emulsificação/evaporação do solvente: (a) nanopartículas na ausência do fotossensibilizador; (b) nanopartículas encapsuladas com o fotossensibilizador ZnPc. ....	32
Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura: (a) nanopartículas de PLA; (b) nanopartículas de PLA encapsulada com fotossensibilizador. ....	33
Figura 7 - Distribuição de tamanho medido por DLS medido para o sistema nanoparticulado: (a) nanopartículas de PLA sem o fotossensibilizador; (b) nanopartículas de PLA com fotossensibilizador encapsulado. ....	34
Figura 8 - Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de NPLA-ZnPc monitorada durante 90 dias após a preparação.....	35
Figura 9 - (a)Espectros de absorção de ZnPc em diferentes concentrações (1,0-4,0 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ ). (b): gráfico da concentração de ZnPc vs. absorbância. ....	36
Figura 10 - Espectros de absorção da ZnPc (1 $\mu\text{mol. L}^{-1}$ ): em solução alcoólica de DMSO 10% (-) e (- -) ZnPc extraída de nanopartículas de PLA. ....	36
Figura 11 - Perfil de liberação in vitro para a ZnPc em solução e encapsulada em nanopartículas dePLA. ....	38
Figura 12 - Análise da viabilidade da linha celular 9L/LacZ. As diferenças estatísticas são marcadas com símbolos: • em comparação com o controle no escuro; em comparação com o controle de luz. (ANOVA, $p \leq 0,05$ ). ....	39
Figura 13 - Imagens de microscopia confocal das células 9L/LacZ após 1 h de incubação com NPLA-ZnPc.Fluorescência azul: DAPI (marcação nuclear); Fluorescência vermelha: ZnPc (0.6 e 3.0 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).....	40

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	Terapia Fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
(ZnPc)	Zinco ftalocianina
DDS	<i>Drug delivery systems</i>
PLA	Ácido polilático
TFDa-	Terapia fotodinâmica antimicrobiana
PLGA	Poli lactídeo-co-glicolídeo
PCL	Poli-ε caprolactona
SDS	Dodecilsulfato de sódio
MTT	5 Difenil-2H-tetrazólio
PCs	Ftalocianinas
PVA	Álcool polivinílico
DCM	Diclorometano
PBS	Solução tampão fosfato
LED	Diodo emissor de luz
S1	Singleto excitado
T1	Tripleto excitado
NPs	Nanopartículas
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
DLS	Espalhamento dinâmico de luz
ED	Emulsão dupla
ANOVA	Análise de variância unidirecional
EE	Eficiência de encapsulamento

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	15
2.1	CÂNCER .....	15
2.2	TERAPIA FOTODINÂMICA .....	17
2.3	FOTOSENSIBILIZADORES.....	19
2.4	ZINCO FTALOCIANINA (ZNPC).....	20
2.5	NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO POR DUPLA EMULSIFICAÇÃO/ EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE .....	22
3	OBJETIVOS .....	24
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS .....	25
4.1	MATERIAIS .....	25
4.2	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA .....	25
4.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	26
4.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NPLA-ZNPC.....	26
4.5	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	27
4.6	RENDIMENTO DO PROCESSO .....	27
4.7	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE) .....	27
4.8	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO <i>IN VITRO</i> ...	28
4.9	A CULTURA DE CÉLULAS.....	28
4.9.1	Ensaio de citotoxicidade das NPLA-ZNPC .....	28
4.9.2	Ensaio de fotocitotoxicidade das NPLA-ZnPC.....	28
4.10	ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN .....	29
4.11	LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR.....	29
4.12	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	31
5.1	SÍNTESE DO SISTEMA NANOPARTICULADO .....	31
5.2	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA .....	32
5.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NPLA-ZNPC.....	33
5.4	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	35
5.5	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO <i>IN VITRO</i> ...	37
5.6	ESTUDO <i>IN VITRO</i> DE CITO E FOTOTOXICIDADE DO SISTEMA NANOPARTICULADO .....	38
5.7	LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR.....	40
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	42
	REFERÊNCIAS .....	44
	ANEXO A - TRABALHO APRESENTADOS .....	51

## 1 INTRODUÇÃO

A nanotecnologia é uma área extensa e heterogênea na qual estruturas em escala nanométrica são projetadas, fabricadas, caracterizadas e aplicadas. O interessante é que as propriedades das nanopartículas podem ser manipuladas para modificar seu tamanho ou forma, sem afetar sua composição química. Sistemas nanoestruturados apresentam tamanho na escala nanométrica e visam contribuir para o aprimoramento tecnológico e científico do país em área inovadora e com potencial elevado de impacto social. Entre os desenvolvimentos mais importantes em nanomedicina estão os sistemas de diagnóstico para a detecção precoce de doenças, revestimentos para melhorar a biocompatibilidade de implantes ou próteses, aditivos para melhorar a solubilidade e biodisponibilidade de drogas, materiais para engenharia tecidual, medicina regenerativa e biomimética, sistemas de encapsulamento, transporte e administração direcionada e controlada de fármacos e genes para tecidos ou células específicas, adjuvantes para vacinas e terapias antitumorais, entre outras.

O câncer é responsável por muitas mortes no mundo, sendo um dos grandes problemas de saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento. Essa doença é responsável pelo crescimento desordenado de células, que invadem tecidos e órgãos, formando tumores que podem se espalhar por todo o organismo.

Existem muitos tratamentos convencionais, os quais incluem cirurgia, medicação tópica, radioterapia e quimioterapia. Em muitos casos, mais de uma modalidade é necessária para o completo tratamento da região afetada. Esses tratamentos são frequentemente agressivos e apresentam diversas reações, como cansaço, perda de apetite, náuseas, insônia, dor, entre outros, prejudicando a qualidade de vida dos pacientes (SALVETTI *et al.*, 2020).

Uma tecnologia promissora no tratamento de câncer, a Terapia Fotodinâmica (TFD), se destaca frente aos tratamentos convencionais, devido ao baixo efeito colateral e à baixa toxicidade, podendo ser aplicada diversas vezes em um curto período, além de ser uma técnica seletiva, ou seja, atinge a região lesionada, em detrimento às células saudáveis. A técnica consiste na combinação de um fármaco fotossensível (FS), luz em um comprimento de onda adequado e oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio como o oxigênio singlete, considerado a principal espécie responsável pela morte celular.

A técnica envolve três pilares: fotossensibilizador (FS), oxigênio molecular e luz (que usualmente vem sendo usada na forma de lâmpadas de LED ou lasers) em um comprimento de onda específico, ocasionando a morte da célula-alvo por ação de espécies reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete.

A TFD vem sendo usada no Brasil para tratamentos dermatológicos desde 2006 e com os avanços recentes da modalidade, em 2014 passou a ser aplicada no país, usando como fonte luminosa a luz do dia para tratamento de ceratose actínica na USP de Ribeirão Preto. Em 2016, pesquisadores do Instituto de Física da USP São Carlos firmaram uma parceria com a Universidade da Carolina do Norte, a fim de estudar o uso de nanopartículas em Terapia Fotodinâmica para o tratamento do câncer de pele do tipo não-melanoma.

A maioria dos fotossensibilizadores, como a Zinco Ftalocianina (ZnPC), são hidrofóbicos e pouco solúvel em água, tendendo assim a formar agregados sob condições fisiológicas, o que reduz a eficácia de ação. O carregamento adequado de fotossensibilizadores em nanopartículas buscando maior solubilidade aquosa e maior tempo de residência no plasma podem tornar a administração intravenosa muito fácil e aumentar a eficiência da TFD no organismo, evitando a agregação dos fotossensibilizadores.

Dentre os sistemas de liberação de fármacos (chamados de *drug delivery systems* – DDS), destacam-se os sistemas nanoparticulados. As nanopartículas têm sido utilizadas como um veículo de entrega de drogas, agentes de contraste de imagem ou para ambos, e mostraram sua capacidade de melhorar a eficácia dos métodos de imagem e terapia existentes, especialmente na detecção e tratamento do câncer, incluindo TFD. O sucesso pode ser atribuído às muitas vantagens resultantes das propriedades inerentes das nanopartículas, incluindo seu tamanho, matrizes inertes e não tóxicas, bem como sua engenharia flexível que permite várias modificações em suas propriedades e multifuncionalidade (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

O ácido polilático (PLA) é um homopolímero de poliéster biocompatível comumente usados no desenvolvimento de formulações biomédicas. As nanopartículas de PLA têm sido utilizadas em sistemas de entrega de drogas para uso sistêmico e tópico, para encapsular compostos hidrofóbicos e melhorar as limitações de solubilidade (JAHNO, 2005).

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho é desenvolver nanopartículas de PLA como modelo de sistema de liberação de fármacos e encapsular a zinco ftalocianina (ZnPc) como modelo de bioativo para aplicações em Terapia Fotodinâmica. A nanotecnologia focada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos busca contribuir com a capacitação científica, tecnológica e de inovação, possibilitando a melhoria na biodisponibilidade e a redução da dose terapêutica e toxicidade.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 CÂNCER

Segundo o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), “a mais recente estimativa mundial, ano 2018, aponta que ocorreram no mundo 18 milhões de casos novos de câncer (17 milhões sem contar os casos de câncer de pele não melanoma) e 9,6 milhões de óbitos (9,5 milhões excluindo os cânceres de pele não melanoma)” (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019, p. 25).

Este fator para o crescimento da incidência do câncer se dá pelo aumento da exposição dos indivíduos a fatores de risco. Os padrões de vida mudaram, como a alimentação e o consumo desenfreado de produtos industrializados, com reflexo no perfil epidemiológico da população em geral. A diminuição das taxas de mortalidade e natalidade, devido às alterações no estilo de vida, provoca o prolongamento da expectativa de vida e o número de idosos, e consequentemente, aumenta a incidência de doenças crônico-degenerativas, especialmente as cardiovasculares e o câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014, 2014).

Nesse sentido,

É incontestável o fato de que hoje, no Brasil, o câncer é um problema de saúde pública e, por isso, seu controle e prevenção devem ser priorizados no país. Assim, foram incluídas ações de controle de câncer entre os 16 Objetivos Estratégicos do Ministério da Saúde para o período 2011-2015, com destaque para as ações de redução da prevalência do tabagismo e de ampliação de acesso, diagnóstico e tratamento em tempo oportuno dos cânceres de mama e do colo do útero, assim como a publicação da nova Política Nacional de Prevenção e Controle de Câncer na Rede de Atenção às Pessoas com Doenças Crônicas. (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA 2014, p. 63).

O câncer é causado, em todos ou em quase todos os casos, por mutação, ou por alguma outra forma de ativação anormal de genes celulares do crescimento e das mitoses celulares. Esses genes anormais são chamados de oncogenes. A probabilidade de mutações pode ser aumentada por muitas vezes quando a pessoa é exposta a certos fatores químicos, físicos ou biológicos, incluindo os seguintes: radiação ionizante, raios x, luz ultravioleta; substâncias químicas, como: corante de anilina, fumaça de cigarro, agrotóxicos, dentre outros, que são denominados carcinogênicos; irritantes físicos, como a abrasão continuada do revestimento do trato intestinal por alguns alimentos; forte tendência hereditária para o câncer (BRASIL, 2014).

O câncer é um processo patológico que começa quando uma célula é transformada por mutação genética do DNA celular, essa célula normal forma um clone e começa a se proliferar de maneira anormal. Então, essas células adquirem características invasivas, podendo infiltrar tecidos circunvizinhos e ganhar acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos, que as levam até outros lugares do corpo. Este fenômeno se chama metástase (disseminação para outras áreas do corpo) (BRASIL, 2012).

De acordo com o Inca (2012), o câncer é uma patologia com localizações e aspectos clinicopatológicos múltiplos e não possui sintomas ou sinais patognomônicos, podendo ser detectado em vários estágios de evolução histopatológica e clínica. Destes fatos resulta, em grande parte, a dificuldade do seu diagnóstico e a afirmativa de que a suspeita de câncer pode surgir diante dos sintomas, os mais variados possíveis.

O paciente, ao procurar um médico, não sabe ainda a natureza da sua doença e, assim, não procura diretamente um especialista. Setenta por cento dos diagnósticos de câncer são feitos por médicos não-cancerologistas, o que evidencia a importância destes profissionais no controle da doença.

Geralmente, o câncer em estado avançado causa dores, de modo que muitos pacientes relatam ficar emocionalmente afetados, sendo uma sensação que se mistura à dor da lesão. Segundo Costa e Chaves (2012):

Dor do câncer tem características de dor aguda e crônica. Como dor aguda, a dor de câncer está diretamente associada com lesão tecidual. Quando a dor do câncer persiste ou agrava, ela pode servir como sinal da progressão da doença e criar a sensação de desesperança porque os pacientes temem que não vale à pena continuar desse jeito, ou pacientes perdem o sentido da vida se deem viver em dor, sendo necessário maior aprofundamento sobre o tratamento da dor oncológica. (COSTA; CHAVES, 2012, p.46).

O médico chega a uma suposição diagnóstica através de várias etapas, durante as quais deve proceder a uma análise cuidadosa, com base, principalmente, em seu conhecimento do caso e da patologia, olhando sempre o paciente como um todo, não se restringindo ao sistema-alvo da sua especialidade. Neste processo, toma diversas decisões, cujo acerto ou erro repercute sobre a sobrevivência do paciente e/ou sua qualidade de vida. No Brasil, muito ainda precisa ser feito para que os médicos assumam a responsabilidade que lhes cabe quanto à prevenção e ao controle do câncer. A adequação das condutas diagnósticas e terapêuticas e a agilidade no encaminhamento do caso constituem o âmago do exercício efetivo de tal responsabilidade.

O diagnóstico de câncer, atualmente, ainda é estigmatizado. O paciente oncológico vivencia inúmeras alterações nas suas necessidades biopsicosócio-espirituais, dentro de sua

realidade objetiva, em consequência à evolução, às formas de tratamento e aos preconceitos e estigmas relacionados à própria doença (KAZMIRCZAK, 2016).

## 2.2 TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) vem se destacando como um tratamento promissor para doenças bacterianas, tratamentos odontológicos, dermatológicos e no tratamento de neoplasias (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010).

De acordo com Setlik e Silva (2015), a busca por alternativas para curar as diversas doenças da vida, ocorre desde o antigo Egito, sendo descrito, na literatura, que alguns compostos ativados pela luz são utilizados para o tratamento de doenças de pele. Com a descoberta da TFD, há mais de cem anos, tem-se observado a inativação de microorganismo corados pela laranja de acridina e esses expostos à luz.

De acordo com Mendonça (2016), algum tempo depois, a TFD foi usada na terapia do câncer, com aplicações tópicas. A TFD utiliza uma fonte de luz e um agente fotossensibilizador. Esta técnica vem sendo investigada, principalmente, para o tratamento de câncer e na foto inativação de microrganismos (Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana – TFDa), por exemplo, no tratamento da onicomicose e na descontaminação oral (SILVA *et al.*, 2013, 2015; PANHÓCA *et al.*, 2016). A associação de luz e produtos químicos para o tratamento de doenças de pele é amplamente utilizada na dermatologia. Esse processo é denominado fotoquimioterapia e o melhor exemplo da técnica é a associação de psoraleno e luz ultravioleta (ALLISON; MOGHISSI, 2013; RKEIN; OZOG, 2014; SILVA *et al.*, 2015; FUJITA *et al.*, 2016).

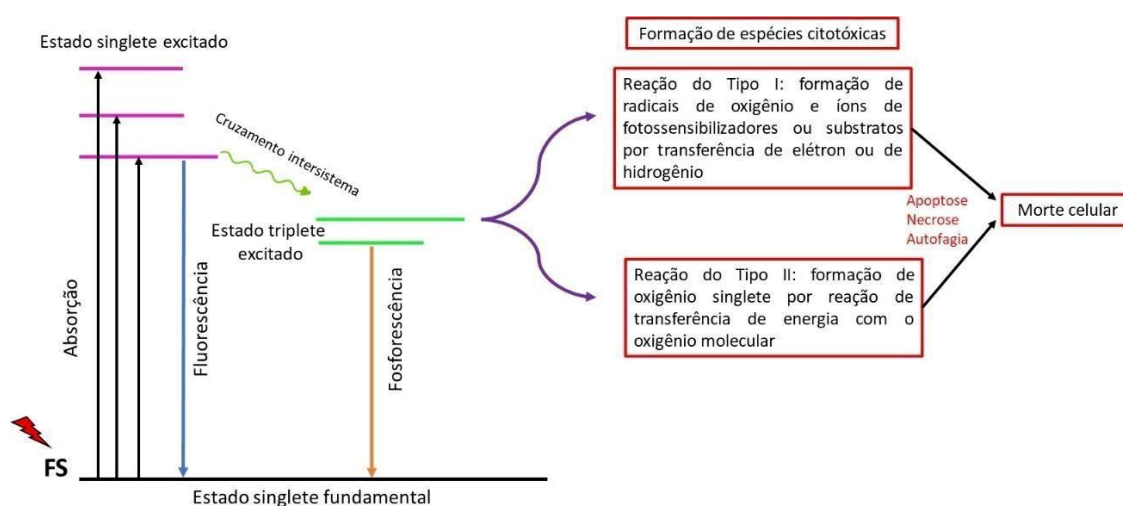
A TFD pode ser considerada uma forma particular de fotoquimioterapia que utiliza fotossensibilizador, luz e oxigênio molecular. A TFD é definida como uma reação fotoquímica usada para destruir seletivamente o tecido. É uma técnica terapêutica em dois estágios, em que o uso de um sensibilizador tópico ou sistêmico é seguido de radiação de luz visível. Os fotossensibilizadores, administrados exogenamente ou formados endogenamente, são ativados pela luz e transferem energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas de oxigênio para induzir a morte celular (SETLIK; SILVA, 2015).

Para o tratamento de tumores do trato gastrointestinal, tumores cerebrais ou tumores broncopulmonares, os fotossensibilizadores são administrados por via oral ou intravenosa. Para tumores endometriais ou carcinoma da bexiga, eles são geralmente administrados por instilação, enquanto para o tratamento de tumores de pele os medicamentos são eficazes quando aplicados topicamente (MENDONÇA, 2016).

O princípio de ação da TFD é baseado na interação da luz com uma substância fotossensível ou fotossensibilizante (fotoceptor exógeno). Esta substância tem a capacidade de absorver a luz (processo foto físico e ou fotoelétrico) e assim realizar os processos fotoquímicos de transferência de energia. Como consequência, gera elevada quantidade de radicais livres, que estimulam o processo inflamatório, podendo desencadear a morte celular, por mecanismos de apoptose, necrose ou autofagia (FUJITA *et al.*, 2016; OZOG *et al.*, 2016; PINTO *et al.*, 2017). (Figura 1).

O procedimento para ação da TFD envolve as seguintes etapas: (1) o fotossensibilizador, após ser administrado sistemicamente, ou topicamente, se acumula preferencialmente nos tecidos alvo; e (2) a luz, em comprimento de onda apropriado, é direcionada para o tecido-alvo para induzir uma reação fotodinâmica entre o fotossensibilizador opticamente excitado e moléculas de oxigênio molecular circundantes, de modo a produzir espécies reativas de oxigênio (EROS) (ver Figura 1) (NOKES *et al.*, 2013; RODRIGUES *et al.*, 2014, 2015; FUJITA, 2016; OZOG *et al.*, 2016).

Figura 1 - Cinética de reação de fotossensibilização levando a TFD (tipos I e II).



Fonte: Elaborado pelo autor.

As reações do tipo I envolvem uma transferência direta de elétron/hidrogênio para o fotossensibilizador, produzindo íons ou abstração de elétron/hidrogênio de uma biomolécula, para formar radicais livres. Estes radicais reagem rapidamente, geralmente com oxigênio molecular, resultando na produção de EROS, como ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. As reações do tipo II envolvem um reação de transferência de energia entre o fotossensibilizador no estado triplete excitado e uma molécula de oxigênio molecular, resultando na formação de oxigênio singlete, o primeiro estado do oxigênio eletronicamente

excitado e altamente reativo. As espécies reativas assim produzidas, via reações do tipo I ou II, atacam as membranas plasmáticas ou organelas subcelulares como a mitocôndria, membrana plasmática, aparelho de Golgi, lisossomos, endossomos e retículo endoplasmático, levando à morte celular por apoptose, necrose e autofagia (SETLIK; SILVA, 2015).

### 2.3 FOTOSSENSIBILIZADORES

A Terapia Fotodinâmica (TFD) envolve a administração sequencial de fotossensibilizadores (FS) e luz aos pacientes. O derivado da hematoporfirina, Photofrin® primeiro medicamento clinicamente aprovado, e atualmente o medicamento mais amplamente utilizado em TFD (ALMEIDA, 2011). Ele é utilizado no tratamento de tumores (cânceres de esôfago e endobrônquico) e para displasia de alto grau no esôfago de Barrett (ALVES, 2010). Eles foram considerados eficazes para o tratamento de cânceres de pele não-melanoma, mas a fotossensibilidade cutânea prolongada limita seu uso a um pequeno número de pacientes selecionados com lesões generalizadas e cirurgicamente inoperáveis (GOMES, 2012).

Estes fotossensibilizadores, chamados de “primeira geração”, apresentam várias desvantagens para aplicação clínica: (1) Photofrin® carece de uma estrutura molecular definida, pois é uma mistura de oligômeros formado por ligações éter e éster de até oito unidades de porfirina (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002), e isso torna a interpretação de seus dados farmacocinéticos difícil; (2) Photofrin® requer luz de excitação em 630 nm para atingir a penetração suficiente no tecido, embora o pico de absorção em 630 nm corresponda ao comprimento de onda com pico de absorção mais fraco do Photofrin® resultando em baixa eficiência em TFD (FERREIRA, 2003); (3) seu acúmulo na pele e eliminação lenta do organismo causam fotossensibilidade cutânea prolongada, com duração de pelo menos 30 dias, mas frequentemente até 90 dias ou mais (BERTOLIN, 2009). Portanto, houve uma forte necessidade de produção de fotossensibilizadores com propriedades melhoradas, em comparação com Photofrin®.

Idealmente, um fotossensibilizador deve: (1) ser composto de um único produto químico de estrutura molecular definida em um sistema altamente purificado e em uma forma estável;

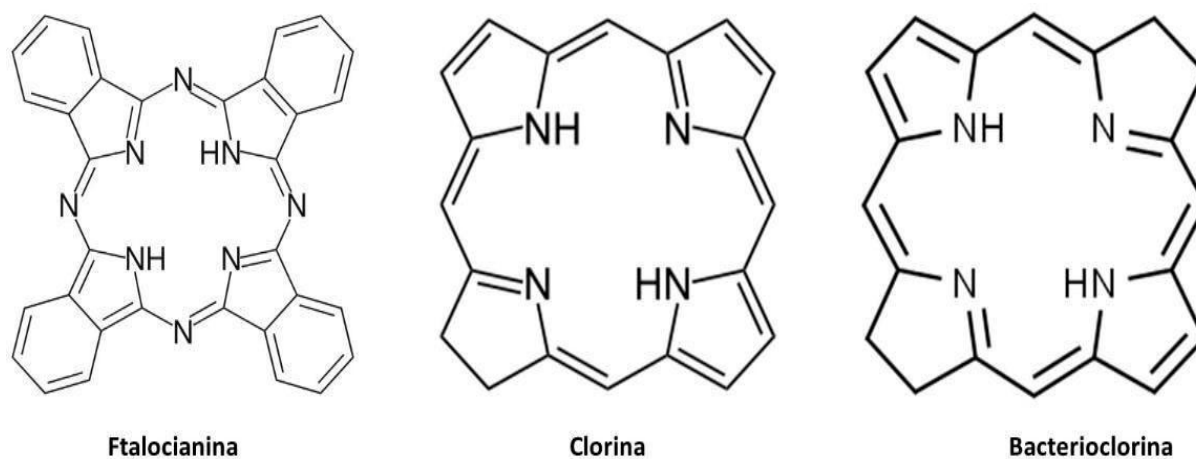
(2) possuir alta capacidade de fotossensibilização; (3) possuir alta fotoestabilidade; (4) apresentar uma absorbância relativamente alta em comprimentos de onda mais longos, para maior penetração no tecido; (5) não exibir toxicidade no escuro; (6) não exibir fototoxicidade cutânea de longo prazo; (7) se acumular seletivamente no tecido-alvo; e (8) sofrer eliminação

rápida do corpo, para evitar fotossensibilidade prolongada (SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002).

Por isso, foram desenvolvidos os fotossensibilizadores de “segunda geração”, que possuem estruturas definidas e/ou banda de absorção principal em comprimento de onda mais longo, na região de 650-800 nm, que é chamada de janela terapêutica, região onde a penetração de luz no tecido é maximizada, sem a interferência de compostos endógenos (FERREIRA, 2003).

Este grupo de FS de segunda geração inclui ftalocianinas, derivados de benzoporfirina, clorinas, bacterioclorinas e outros. (Figura 2). Esses avanços e resultados de ensaios clínicos bem desenhados e em andamento outros, argumentam a favor de um maior desenvolvimento da TFD com a entrega sistêmica da droga como uma modalidade terapêutica viável em breve. Finalmente, uma melhor compreensão dos mecanismos subjacentes à apoptose induzida pela TFD e modulação das respostas imunes, pode abrir novas perspectivas interessantes da TFD sistêmica para várias novas aplicações terapêuticas, nomeadamente doenças inflamatórias e infecciosas da pele (PERUSSI, 2007).

Figura 2 - Estrutura química de alguns fotossensibilizadores de segunda geração.



Fonte: Elaborado pelo autor.

#### 2.4 ZINCO FTALOCIANINA (ZNPC)

As ftalocianinas (PCs) são um tipo de fotossensibilizador com promissoras propriedades eletroquímicas, fotoquímicas e térmicas (MONDAL, 2014).

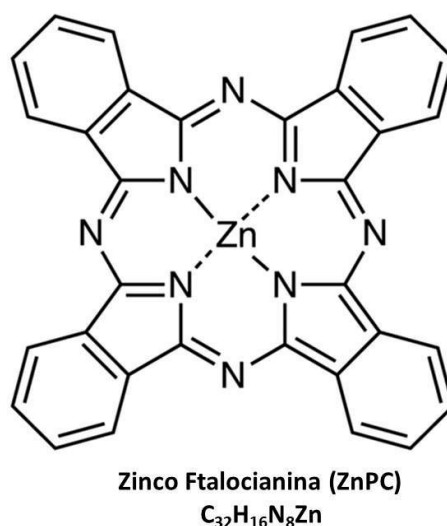
PCs são heterociclos aromáticos que consistem em quatro unidades de isoindoles ligados por átomos de nitrogênio. Eles têm um espectro de absorção UV-vis característico com duas

bandas principais: a banda Soret fraca localizada na zona UV do espectro a  $\sim 350$  nm e a banda Q, localizada na zona vermelha do espectro visível em torno 680 nm, cuja alta intensidade é uma das principais características destes corantes com um coeficiente de extinção molar de  $1 \times 10^5 \text{ mol.L}^{-1}\text{cm}^{-1}$ , duas ordens de magnitude maiores do que a maioria das porfirinas (SEMYACHKINAGLUSHKOVSKAYA, 2020).

Suas propriedades fotoquímicas são fortemente influenciadas pela natureza do íon metálico central coordenado ao macrociclo. Assim, a presença de elementos diamagnéticos na cavidade central, como zinco (II), alumínio (III), gálio (III) ou silício, dá-lhes altos rendimentos quânticos tripleto ( $\Phi_T > 0,4$ ) com vida longa para o estado tripleto ( $\tau_T > 100 \mu\text{s}$ ), tornando-os geradores eficientes de oxigênio singleto ( $\Phi_\Delta > 0,4$ ) (DURMUŞ, 2007).

A zinco ftalocianina (ZnPc) (Figura 3) tem características vantajosas, incluindo baixa toxicidade no escuro, alta estabilidade química e fotoquímica, alto efeito terapêutico, fotossensibilidade mínima da pele e excitação em comprimentos de onda maiores do que 630 nm, o que permite maior penetração da radiação no tecido (SIBATA *et al.*, 2004).

Figura 3 - Estrutura química do fotossensibilizador zinco ftalocianina (ZnPc).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Apesar dessas características atrativas, uma desvantagem das PCs é sua baixa solubilidade em solução aquosa, o que limita sua aplicação clínica (LI *et al.*, 2019). Por outro lado, a formação de agregados em solução diminui a capacidade de produzir oxigênio singleto, porque a atividade fotoquímica está relacionada exclusivamente às espécies monoméricas (DE SOUZA *et al.*, 2018).

Assim, os agregados diminuem não só a fotoatividade do FS, mas também limitam o acesso a células neoplásicas, afetando sua biodisponibilidade (TSUBONE, 2014). Uma das maneiras de solucionar o problema de solubilidade e formação de agregados em ambiente fisiológico é a veiculação das ftalocianinas em sistemas de liberação de fármacos, como os sistemas nanoparticulados (TSUBONE, 2014).

## 2.5 NANOPARTÍCULAS DE ÁCIDO POLILÁCTICO POR DUPLA EMULSIFICAÇÃO/ EVAPORAÇÃO DO SOLVENTE

Emulsões duplas, chamadas de emulsões Água-Óleo-Água (A/O/A), consistem em gotículas de água dispersas em óleo ou glóbulos de óleo/polímero, e finalmente dispersas em uma fase aquosa. Tal estrutura se apresenta altamente interessante para encapsular moléculas muito diferentes e até mesmo incompatíveis (por exemplo, hidrofóbicas e hidrofílicas) em um único transportador (GOMES, 2015).

Nos últimos 30 anos, as emulsões duplas têm recebido um importante interesse na formulação de produtos farmacêuticos, incluindo transportadores de drogas, sangue substituto (LI *et al.*, 2016), vacinas e vitaminas (LI *et al.*, 2012) e enzimas (HUANG *et al.*, 2015). Portanto, o projeto de emulsões duplas foi amplamente modificado em função das especificações e da diversidade das aplicações pretendidas.

Na verdade, diferentes tipos de emulsões duplas foram desenvolvidos, como emulsão dupla à base de óleo, micropartículas poliméricas, nanopartículas (IQBAL *et al.*, 2015), nanocápsulas, molde de emulsões duplas para a geração de micelas e lipossomas (ALLEN; CULLIS, 2013). No entanto, a particularidade comum de todos esses sistemas reside no fato de que foram preparados por um processo de emulsificação em duas etapas. Conclui-se, daí, que uma compreensão profunda deste processo de emulsificação de “duas etapas” parece crucial para a preparação, adaptação e otimização de emulsões duplas.

A literatura revisou vários aspectos específicos relacionados às emulsões duplas, como sua estabilidade estrutural, os fenômenos de transporte entre as diferentes fases, Poli (lactídeo-coglicolídeo) carreador polimérico à base de emulsão dupla (IQBAL *et al.*, 2015), formulação microfluídica de emulsões duplas (CHONG *et al.*, 2015) e assim por diante.

Devido às vantagens reais dos polímeros biocompatíveis, como o PLGA, Poli (ácido láctico) (PLA) e Poli-ε caprolactona PCL no encapsulamento e liberação controlada de moléculas hidrofílicas (como as ftalocianinas), tais sistemas micro e nanoparticulados foram inicialmente preparados com emulsão dupla como molde de acordo com um método de emulsificação de dois passos.

Ogawa *et al.* (1987) descreveram primeiramente o procedimento experimental padrão como segue: 1) O polímero é dissolvido no solvente orgânico, imiscível com água, no qual são solubilizados os medicamentos hidrofílicos. A emulsão A/O é fabricada com essas duas fases; 2) A emulsão dupla A/O/A é então formulada com (outra) fase aquosa externa; 3) A última etapa consiste na evaporação do solvente orgânico, precipitando o polímero na forma de micro ou nanocápsulas sólidas.

Inicialmente, Ogawa *et al.* (1987) sintetizaram micropartículas de PLA ou PLGA para ser dissolvido em diclorometano usado como fase oleosa, e um análogo hidrofílico do hormônio luteinizante foi encapsulado na matriz de micropartículas poliméricas de acordo com o método descrito acima. Uma vez que nenhum surfactante hidrofóbico foi adicionado à fase de óleo, uma ampla distribuição de tamanho de micropartículas foi obtida (de 30 a 125  $\mu\text{m}$ ), o tamanho foi controlado apenas pelo parâmetro de processamento (usando peneiras de diferentes aberturas).

Os polímeros tornaram-se veículos de entrega de drogas cada vez mais populares nas últimas décadas para aplicações que variam de terapia direcionada para neoplasias (VIANA, 2015), modulação do sistema imunológico. Fármacos encapsulados ou conjugados com polímero são frequentemente mais eficazes do que seus constituintes em sua forma livre, uma vez que o fármaco associado ao polímero é protegido da degradação (RUELA, 2015). Esta proteção se traduz em uma meia-vida biológica mais longa e eficácia potencialmente melhorada com efeitos colaterais sistêmicos reduzidos (CARVALHO, 2015).

O Poli (ácido lático) (PLA) exibe muitas das propriedades ideais de um sistema de entrega em nanoescala, proporcionando liberação de longo prazo do agente encapsulado (TRACZYNSKI, 2016). Moléculas bioativas, proteínas e ácidos nucleicos que são encapsulados em nanopartículas de PLA demonstraram atividade aprimorada em uma variedade de aplicações de doenças (SANTOS, 2019). Porém, o desenvolvimento de nanopartículas de PLA sintetizadas pelo método de dupla emulsão/evaporação do solvente para encapsular ftalocianinas tem recebido pouca atenção pela comunidade acadêmica.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de PLA fabricadas pelo método de dupla emulsificação/evaporação do solvente para encapsular a zinco ftalocianina (ZnPc) como modelo de sistema de liberação para aplicações em Terapia Fotodinâmica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver nanopartículas de PLA pelo método de dupla emulsificação/evaporação do solvente;
- Encapsular o fármaco fotossensibilizador ZnPc 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 foram realizados no laboratório de síntese orgânica localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

### 4.1 MATERIAIS

Zinco ftalocianina, dodecilsulfato de sódio (SDS) e brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) 2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Álcool polivinílico (PVA) foi adquirido da empresa Vetec. O polímero poli (ácido láctico) (PLA) foi doado pelo Instituto

Granado de Tecnologia da Poliacrilonitrila (IGTPAN). Os solventes utilizados foram da marca Synth. A linhagem de células 9 L/LacZ (BCRJ® CRL-2200TM) foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) – Brasil. DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) (ProLong™ Diamond Antifade Mountant) foi adquirido da Termofisher.

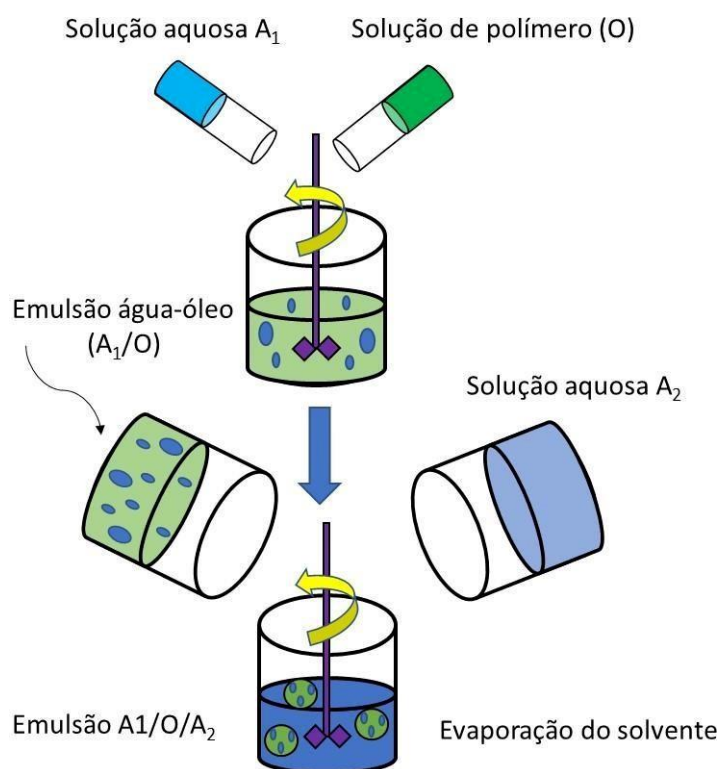
### 4.2 PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLA

ZnPc encapsulada em nanopartículas de PLA (NPLA-ZnPc) foram obtidas usando a técnica de dupla emulsão (A/O/A) descrita por Montiel-Eulefi e colaboradores (2014) com pequenas modificações.

Resumidamente, uma solução aquosa de SDS (10 mL, 12 mmol.L<sup>-1</sup>) (A<sub>1</sub>) foi homogeneizada com 200 mg de PLA solubilizado em 4 mL de diclorometano (DCM) contendo o fotossensibilizador ZnPc (20 mg/mL) (O), utilizando um homogeneizador de alta velocidade (Ultraturrax T18-IKA) por 1 minuto, formando a primeira emulsão A<sub>1</sub>/O.

Posteriormente, a emulsão A<sub>1</sub>/O formada foi adicionada, gota-a-gota, em um solução aquosa de dodecil sulfato de sódio (SDS, 12 mmol.L<sup>-1</sup>) (A<sub>2</sub>) e homogeneizada utilizando alta velocidade por 5 min. A emulsão A<sub>1</sub>/O/A<sub>2</sub> formada foi suavemente agitada em temperatura ambiente até o solvente ser completamente evaporado (Figura 4). As nanopartículas foram purificadas pela aplicação de dois ciclos de centrifugação (40.000 g) e reconstituída em água desionizada. Nanopartículas na ausência do FS foram preparadas usando o mesmo método, apenas substituindo a solução de fotossensibilizador por DCM.

Figura 4 - ZnPc encapsulada em nanopartículas de PLA preparadas pela técnica de dupla emulsão (A1/O/A2).



Fonte: Elaborado pelo autor.

### 4.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A morfologia das nanopartículas foi examinada por microscopia eletrônica de varredura - MEV (EVO-MA10, Zeiss-Alemanha). As superfícies foram preparadas usando revestimento de ouro. Imagens de MEV foram tiradas a 10 kV com ampliação de 5000, e uma barra de escala de 10  $\mu\text{m}$  foi usada.

### 4.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NPLA-ZNPC

O tamanho de partícula e o potencial zeta das NPLA-ZnPc foram medidos usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, Reino Unido). Para a medição do DLS, as partículas foram dispersas em água destilada e medidas em um ângulo de dispersão de 173° à temperatura ambiente. Para o teste de estabilidade, a distribuição de tamanho e o potencial zeta da amostra foram coletados em diferentes tempos de armazenamento, por 90 dias.

#### 4.5 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO

As propriedades fotofísicas das NPLA-ZnPc foram investigadas por espectroscopia de absorção de UV-vis usando um espectrofotômetro Varian Cary 50 à temperatura ambiente. A curva de calibração foi construída em sete níveis de concentração dentro da faixa de 1,0 – 4,0  $\mu\text{mol. L}^{-1}$  pelo método espectrofotométrico, para estabelecer a linearidade do método proposto e comprovar a lei de Beer. A análise de regressão pelo quadrado mínimo foi realizada para os dados. A análise de variância unidirecional (ANOVA) e o teste de falta de ajuste ( $p = 0,05$ ) foram utilizados para determinar se o modelo linear explica adequadamente os dados obtidos.

#### 4.6 RENDIMENTO DO PROCESSO

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

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

O método de encapsulamento foi realizado em triplicata ( $n = 3$ ).

#### 4.7 DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE)

A quantidade de fármaco adsorvido ou encapsulado nas nanopartículas de PLA foi determinada a partir da quantidade de ZnPc livre no sobrenadante após o processo de centrifugação, determinado por espectroscopia de absorção por UV-vis. A eficiência de associação/encapsulamento de ZnPc nas nanopartículas de PLA foi determinada a partir da equação (2):

$$EE (\%) = ([\text{peso do ZnPc total} - \text{peso do ZnPc no sobrenadante}]) / (\text{peso do ZnPc total}) \times 100 \quad (2)$$

Uma curva de calibração padrão do pico máximo de absorção (a 675 nm) *versus* concentração, usando concentrações conhecidas de ZnPc em solução alcoólica de DMSO 10% foi plotada para quantificar a ZnPc livre.

#### 4.8 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO *IN VITRO*

Para avaliar o desempenho de liberação de drogas *in vitro* do FS a partir de nanopartículas poliméricas de PLA, 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 ZnPc no sobrenadante foi determinada pela absorbância UV-Vis a 675 nm, usando uma curva de calibração de ZnPc em solução alcoólica de DMSO 10%. Os dados foram relatados como média  $\pm$  DP, com base em medidas triplicadas.

#### 4.9 A CULTURA DE CÉLULAS

A linha celular 9 L/LacZ (BCRJ® CRL-2200TM) foi adquirida no Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ) – Brasil, onde foram testadas e consideradas isentas de contaminação e mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Meio Eagle modificado) adquirido da Sigma Aldrich, suplementado com 10% de soro fetal bovino, solução de penicilina/estreptomicina a 1% (LGC Biotechnology), embalado em uma incubadora a 37 ° C com 5% de CO<sub>2</sub>.

##### 4.9.1 Ensaio de citotoxicidade das NPLA-ZNPC

Todos os testes foram realizados duas repetições em quadruplicata em placas de 96 poços, e a concentração de células foi de  $5 \times 10^6$  células por poço. Para os testes, as NPLA-ZnPc foram aplicadas nas concentrações de 3,0  $\mu\text{g/mL}$  e 0,6  $\mu\text{g/mL}$  e incubado por 1 h em câmara de cultivo a 37° C. Após o tempo de incubação, o meio com micropartículas foi retirado e adicionado a 200  $\mu\text{L}$  de PBS em cada poço. Os grupos escuros foram mantidos no escuro e os grupos irradiados foram submetidos à exposição à luz em um dispositivo à base de LED (Biopdi/Irrad-Led 660). Após a irradiação, o PBS foi retirado de todos os grupos, substituído por um meio fresco e mantido a 37 °C por 18h, antes dos ensaios do Azul de Tripán.

##### 4.9.2 Ensaio de fotocitotoxicidade das NPLA-ZnPc

O dispositivo LED utilizado nos experimentos de PDT é composto por 54 LEDs, e cada LED apresenta uma potência de 70 mW, emitindo em  $660 \pm 5$  nm e cobrindo uma área de 150

cm<sup>2</sup>. A intensidade utilizada foi de 25 mW.cm<sup>-2</sup> e o tempo de exposição de 6 min e 40 s, totalizando a densidade de energia de 10 J.cm<sup>-2</sup>.

#### 4.10 ANÁLISE DE VIABILIDADE CELULAR ATRAVÉS DO MÉTODO DE EXCLUSÃO DE AZUL DE TRIPAN

O ensaio de exclusão por azul de tripan é um método utilizado para avaliar a citotoxicidade e a fototoxicidade onde é mensurando a viabilidade celular pela integridade da membrana celular. Baseia-se no fato que as células mortas absorvem o Azul de Tripán para seu citoplasma por perda de seletividade da membrana.

Para a avaliação da viabilidade foi utilizado o método de exclusão por Azul de Tripán. Esse teste permite separar células vivas de mortas, pois células viáveis não permitem a entrada do corante, já as células mortas ficam coradas em azul e as incolores vivas. Trata-se de um método eficaz, pois o método é barato e o rompimento da membrana plasmática é um fato que determina a morte celular. Realizado os ensaios de cito e fototoxicidade, após um período de 24 horas, o meio foi retirado e adicionado o Azul de Tripán na concentração de 0,2%, e incubado por 5 minutos. Após esse período, o Tripán foi retirado e foi adicionado PBS, e os grupos foram analisados em microscópio invertido, onde foram capturadas imagens das células. Para cada grupo foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios. As células vivas e mortas foram analisadas utilizando o software ImageJ.

#### 4.11 LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR

Para determinar a internalização das nanopartículas de PLA, as células foram incubadas com 3,0 µg/mL e 0,6 µg/mL de ZnPc incorporadas em nanopartículas de PLA por uma hora, em estufa a 37° C. Após esse período, o meio foi removido, os poços lavados com PBS e adicionados 100 µL de paraformaldeído 4%. Após a fixação, a marcação com DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato) (Thermofisher - ProLong™ Diamond Antifade Mountant com DAPI) foi realizada para marcação de DNA. Todo o processamento foi realizado no escuro e as lâminas examinadas em um microscópio confocal LSM 700 Zeiss. Para o marcador DAPI foi utilizada excitação em 405 nm e emissão captada em 461 nm.

#### 4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os testes foram realizados em quadruplicata, e todos os dados foram submetidos à ANOVA, seguida do teste de Tukey. O Microsoft Excel foi usado para gerar os gráficos. Todos os dados são expressos como a média  $\pm$  desvio padrão (SD). Um valor de probabilidade de  $p < 0,05$  foi considerado significativo neste estudo.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE DO SISTEMA NANOPARTICULADO

As nanopartículas de PLA foram sintetizadas e carregadas com zinco ftalocianina pelo método de dupla emulsificação/evaporação do solvente, conforme descrito na sessão 4.2.

A emulsão dupla (ED) tem a capacidade de preparar partículas poliméricas, que permitem a liberação controlada de ingredientes ativos solúveis na fase aquosa interna ou dispersa na matriz polimérica (LI *et al.*, 2016). Sua função principal é considerada um reservatório interno para ingredientes ativos aprisionados, e que pode proteger o ingrediente sensível aprisionado contra a luz, degradação enzimática e oxidação (CONTO *et al.*, 2012). Também permite a liberação lenta e sustentada de ingredientes ativos do reservatório interno para o meio de dispersão externa e sua importância chave é devido à sua capacidade de encapsular alguns ativos solúveis em água e ingredientes ativos lipofílicos. A emulsão dupla é um processo único que engloba a vantagem de encapsular moléculas de drogas lipofílicas e hidrofílicas (CHONG *et al.*, 2015).

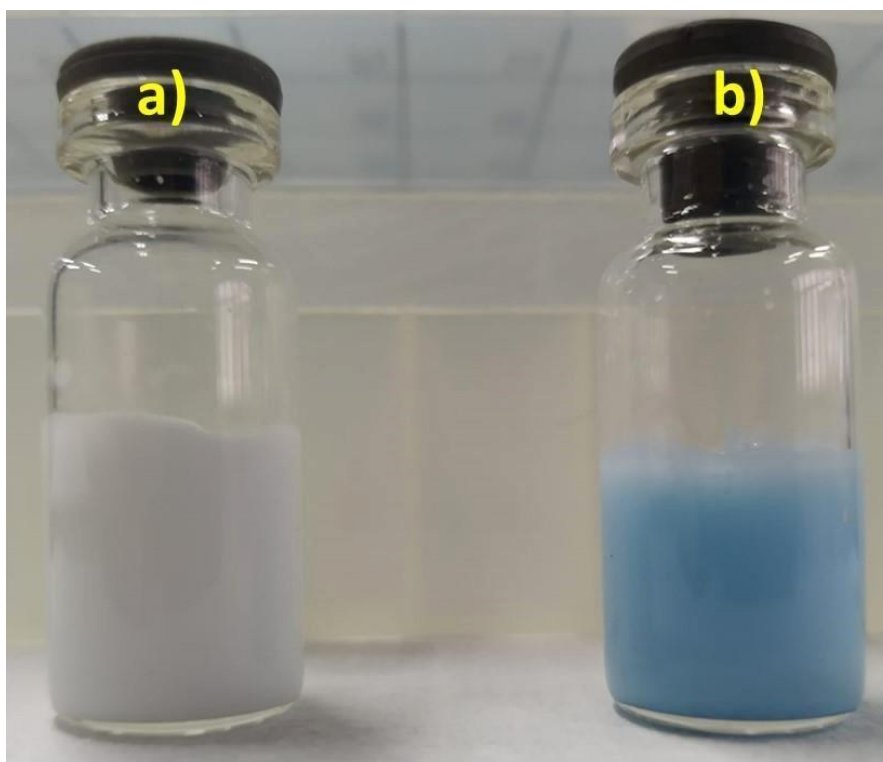
Neste método para a incorporação de ativos hidrofóbicos, a homogeneização é realizada em duas etapas; na primeira etapa, a fase aquosa interna ( $A_1$ ) é preparada na presença de um estabilizante (SDS). Os estabilizadores tornam possível manter as características físico-químicas de uma dispersão de duas ou mais fases imiscíveis e evitar a separação de fases, tornando o sistema de emulsão mais estável (CHONG *et al.*, 2015). Então, o polímero (PLA)/drogas lipofílicas (ZnPc) são adicionados à fase oleosa (O), de modo que ambas as fases são homogeneizadas por agitação adequada para formar a emulsão primária ( $A_1/O$ ). Em seguida, a emulsão primária é emulsionada com a fase aquosa, contendo um estabilizador apropriado (SDS) para formar dupla emulsão ( $A_1/O/A_2$ ) (OGAWA *et al.*, 1987).

A formação de emulsão dupla (dispersão particulada) é seguida pela evaporação do solvente orgânico (O) da fase dispersa levando a um ponto de insolubilidade e, conseqüentemente, a precipitação do polímero encapsulando com o material bioativo (SÁ *et al.*, 2014). O solvente pode ser evaporado sob pressão reduzida via evaporador rotativo ou por simples agitação à temperatura ambiente, dependendo do ponto de ebulição do solvente orgânico (SOUZA *et al.* 2015). Neste trabalho, o solvente diclorometano foi evaporado por meio de agitação mecânica em temperatura ambiente devido à alta volatilidade deste solvente (temperatura de ebulição = 39,6° C). A fase aquosa exterior atua como meio de dispersão e a

agitação pode ser fornecido por agitação mecânica ou sonicação, dependendo da natureza do medicamento a ser encapsulado e o pretendido tamanho da partícula (CAMPOS, 2012).

Todas as preparações de nanopartículas aqui descritas foram estáveis durante o período de avaliação de 90 dias sem degradação do fotossensibilizador ou alterações na solução (como precipitação ou separação de fases) (Figura 5).

Figura 5 - Formulação de nanopartículas de PLA sintetizadas via dupla emulsificação/evaporação do solvente: (a) nanopartículas na ausência do fotossensibilizador; (b) nanopartículas encapsuladas com o fotossensibilizador ZnPc.



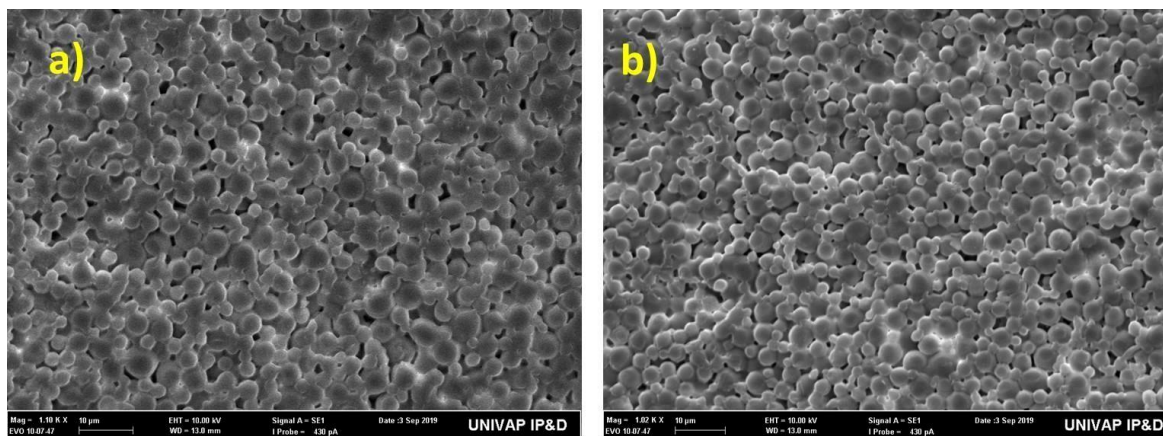
Fonte: Elaborado pelo autor.

A suspensão de NPLA-ZnPc foi armazenada a 4°C. Essa temperatura foi relatada como indicada, por não haver diferenças significativas no tamanho, potencial zeta e valores de PDI (índice de polidispersividade) em nanopartículas (RAO *et al.*, 2006).

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A micrografia eletrônica de varredura do sistema nanoparticulado produzido é mostrada na Figura 6, a seguir. A forma das nanopartículas obtidas pelo método de dupla emulsificação/evaporação do solvente foi esférica e uniforme, conforme visualizado nas fotografias de MEV.

Figura 6 - Microscopia eletrônica de varredura: (a) nanopartículas de PLA; (b) nanopartículas de PLA encapsulada com fotossensibilizador.



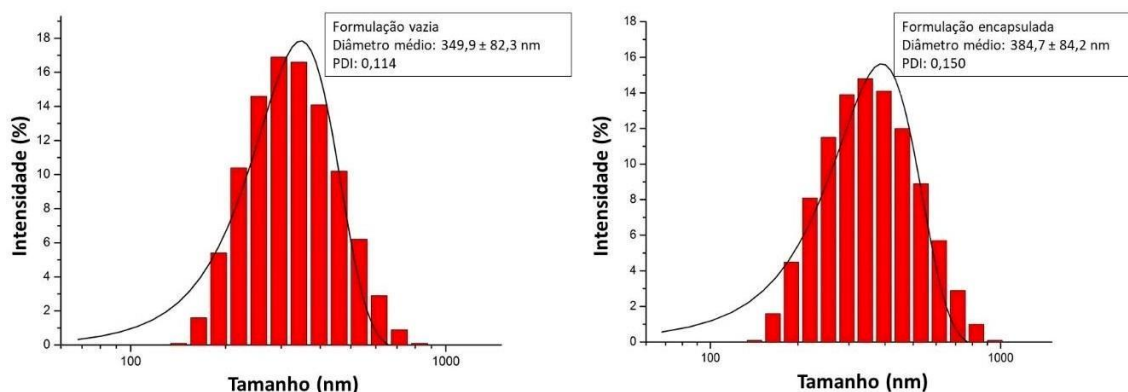
Fonte: Elaborado pelo autor.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NPLA-ZNPC

As nanopartículas de PLA foram analisadas por meio do tamanho de partícula, índice de polidispersidade (PDI) e potencial zeta usando um Zetasizer. O tamanho de partícula foi medido usando a técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), que mede a difusão de partículas movendo-se sob o movimento browniano. Essas medidas são convertidas para tamanho e uma distribuição de tamanho aplicando a Relação Stokes-Einstein é obtida. Simultaneamente, o PDI, que é uma medida da homogeneidade das partículas na dispersão também foi medido (Figura 7).

As nanopartículas obtidas pelo método de ED exibiram diâmetros na faixa de 350 nm, conforme mostrado na Figura 7, a seguir, com uma distribuição de tamanho estreita ( $PdI \leq 0,1$ ).

Figura 7 - Distribuição de tamanho medido por DLS medido para o sistema nanoparticulado: (a) nanopartículas de PLA sem o fotossensibilizador; (b) nanopartículas de PLA com fotossensibilizador encapsulado.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As nanopartículas tiveram 80,3% de eficiência de encapsulamento, com tamanho médio de partícula de 384,7 nm e índice de polidispersidade de 0,150. Byun et. al (2011), sintetizaram nanopartículas de policaprolactona PCL carregadas com  $\alpha$ -tocoferol, usando o método de dupla emulsão/evaporação de solvente. Os autores relatam que as nanopartículas tiveram 91% de eficiência de encapsulamento, um tamanho médio de partícula de 368 nm e índice de polidispersidade de 0,27.

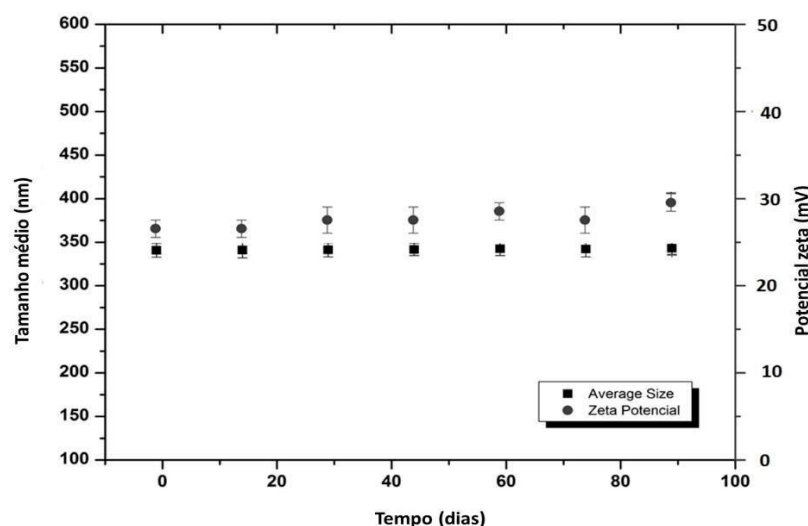
O potencial zeta de uma partícula é a carga total adquirida por ele em um meio específico. Esta técnica mede a mobilidade eletroforética exibida por uma partícula carregada, em um meio de dispersão conectado com um par de eletrodos. Quando uma tensão é aplicada, esta partícula se move com uma velocidade em direção ao eletrodo opostamente carregado.

O potencial zeta para formulação de NPLA foi de  $-25,8 \pm 3,7$  mV. A formulação de NPLAZnPc apresentou potencial zeta de  $-27,5 \pm 3,2$  mV. Os potenciais zeta negativos são atribuídos à presença de ácido carboxílico livre como grupo final na estrutura química do PLA (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). O alto potencial zeta negativo também foi responsável por boas condições físicas e estabilidade da formulação desenvolvida neste trabalho.

Srikar e colaboradores (2019) sintetizaram nanocápsulas de PLA de núcleo aquoso encapsuladas com fumarato de tenofovirdisoproxil preparadas pela técnica de dupla emulsificação. Os autores encontraram um potencial zeta de -19.66 mV.

A Figura 8 mostra a evolução temporal do tamanho e do potencial zeta para NPLA- ZnPc. As amostras foram mantidas no escuro. As análises foram realizadas em função do tempo por 90 dias em água ultrapura.

Figura 8 - Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de NPLA-ZnPc monitorada durante 90 dias após a preparação.



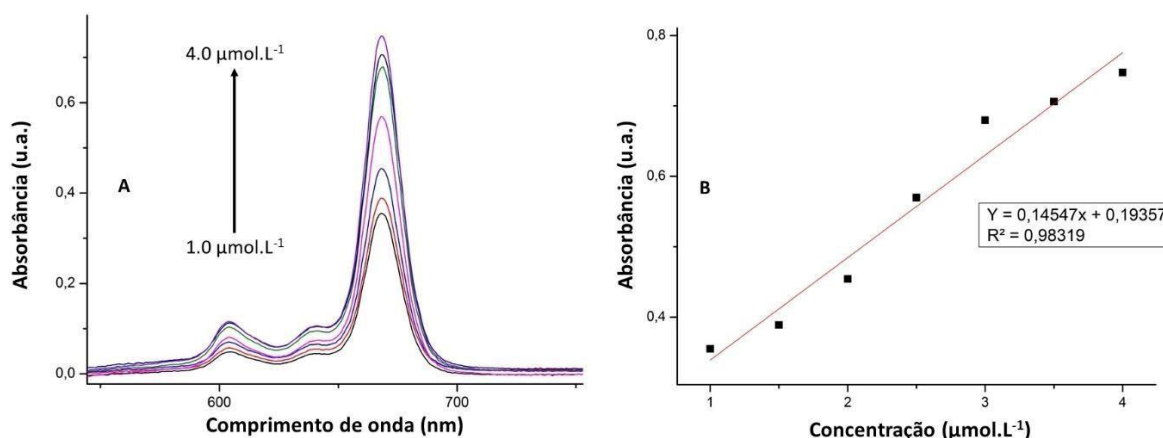
Fonte: Elaborado pelo autor.

Valores de potencial zeta na faixa de 15 a 30mV são ideais para nanopartículas estabilizadas (SILVA, 2019). A repulsão eletrostática entre as partículas com altos valores de potencial zeta negativo impede sua agregação e, assim, estabiliza a dispersão nanoparticulada (SILVA *et al.*, 2015). O alto potencial zeta negativo também foi responsável por boas condições físicas e estabilidade na formulação desenvolvida neste trabalho.

#### 5.4 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de obter resultados de teste diretamente proporcionais à concentração do analito. As análises de regressão linear foram realizadas plotando a intensidade da absorbância versus a concentração do fármaco ( $\mu\text{mol. L}^{-1}$ ) e foram determinadas por espectroscopia UV-Vis, registrando uma curva de calibração (Figura 9a). Linearidade satisfatória foi detectada pelo método espectrofotométrico na faixa de concentração de 1,0 a 4,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . A regressão pelo quadrado mínimo para o método espectrofotométrico mostrou excelente coeficiente de correlação ( $r = 0,98319$ ) e a equação linear foi:  $\text{absorbância} = 0,14547 \times [\text{ZnPc, concentração em } \mu\text{mol.L}^{-1}] + 0,19357$  (Figura 9b).

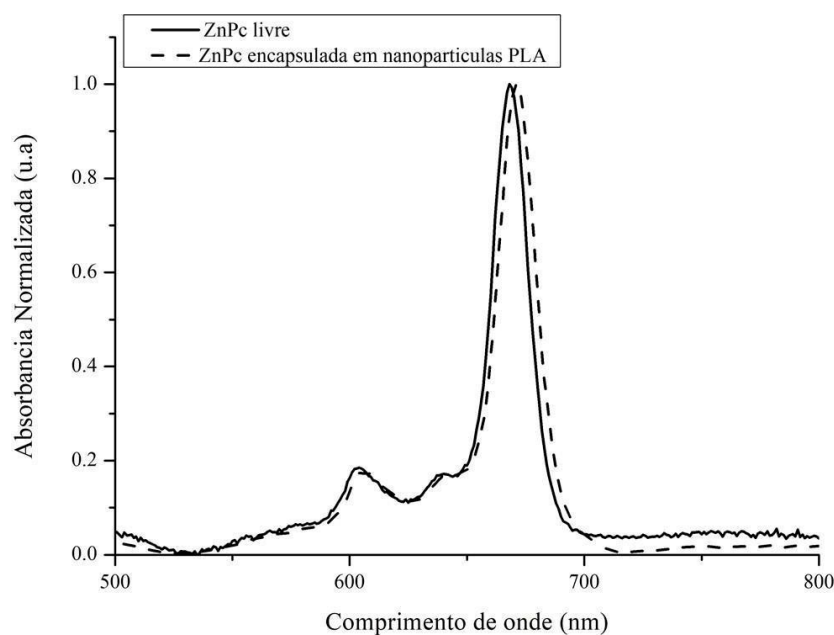
Figura 9 - (a) Espectros de absorção de ZnPc em diferentes concentrações (1,0-4,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ). (b): gráfico da concentração de ZnPc vs. absorbância.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As nanopartículas foram caracterizadas no estado estacionário por espectroscopia de absorbância na região do Uv-vis. Os espectros de absorção do padrão ZnPc ( $1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) e extraídos das nanopartículas de PLA em solução alcoólica de DMSO 10% foram ilustrados na Figura 10, a seguir.

Figura 10 - Espectros de absorção da ZnPc ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ): em solução alcoólica de DMSO 10% (-) e (-) ZnPc extraída de nanopartículas de PLA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As moléculas orgânicas de ftalocianina e seus derivados apresentam características ópticas devido à sua estrutura em anel. Elas têm dois tipos de faixas de energia; Banda B (banda  $\gamma$  ou Soret) e banda Q (banda  $\alpha$  em porfirina) (PEREIRA, 2004). O pico em 618 nm da banda Q é atribuído à primeira transição  $\pi - \pi$  no macrociclo da ftalocianina e o ombro em 675 nm pode ser atribuído a um estado de excitação (CAIXETA *et al.*, 2018).

O pico máximo localizado em 675 nm corresponde à absorção de luz na região onde a penetração de luz no tecido é maximizada. O comprimento de onda da luz usado para TFD está normalmente na faixa de comprimento de onda entre 600-800 nm, a chamada "janela terapêutica" (SILVA., 2018). Nesta faixa de comprimento de onda, a energia de cada fóton ( $h\nu$ ) é alta o suficiente ( $> 1,5$  eV) para excitar o fotossensibilizador, e ainda assim é baixa o suficiente para que a luz tenha penetração suficiente no tecido (TOFFOLI, 2008). A absorção de fótons em comprimentos de onda maiores que 800 nm não oferece energia suficiente para excitar o oxigênio molecular ao seu estado singlete, uma das principais espécies reativas formadas na irradiação (GRECCO, 2013).

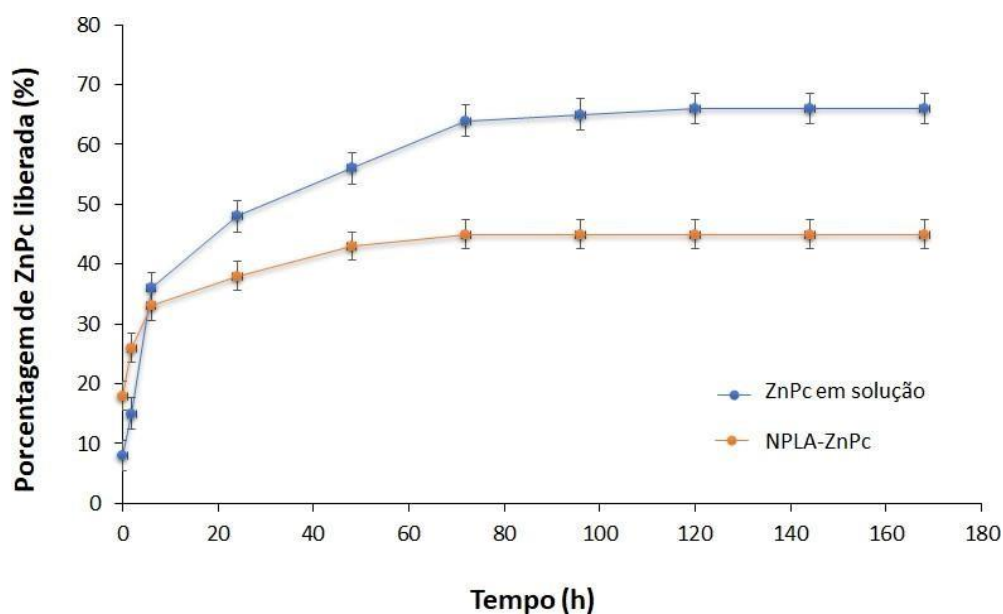
A agregação de ftalocianinas hidrofóbicas, como ZnPc, pode ocorrer em ambiente aquoso, o que pode degradar o desempenho das moléculas em várias aplicações, devido à alteração de suas propriedades fotofísicas (BAGNATO, 2008).

Os agregados em solução exibem alterações distintas na banda de absorção em comparação com as espécies monoméricas. Assim, se o fotossensibilizador ZnPc estiver presente no meio na forma de agregação de dímeros, poderíamos observar alterações no perfil espectral do fármaco, o que não foi observado. Neste estudo, não houve mudança de banda na análise espectroscópica, na faixa de concentração estudada, sugerindo que o FS está no estado monomérico quando é encapsulado no sistema de liberação em estudo.

## 5.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO *IN VITRO*

O comportamento de liberação *in vitro* da ZnPc no sistema nanoparticulado foi investigado (Figura 11).

Figura 11 - Perfil de liberação *in vitro* para a ZnPc em solução e encapsulada em nanopartículas dePLA.



Fonte: Elaborado pelo autor.

A formulação produziu um perfil de liberação para a ZnPc bifásico com um efeito de explosão (*burst*) inicial em que a liberação de ZnPc variou entre 38% e 48% dentro do primeiro tempo de amostragem (24 h) para NPLA-ZnPc e ZnPc livre, respectivamente. Esta liberação rápida está relacionada à ZnPc adsorvida na superfície das nanopartículas (DA VOLTA SOARES, *et al.*, 2011). e/ou à liberação do fármaco encapsulado próximo à superfície das nanopartículas. Após esta fase, uma liberação lenta de ZnPc constante até 66% e 45% para NPLA-ZnPc livre e ZnPc livre, respectivamente, 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 (LEE; YEO, 2015).

## 5.6 ESTUDO *IN VITRO* DE CITO E FOTOTOXICIDADE DO SISTEMA NANOPARTICULADO

A biocompatibilidade e o efeito fotodinâmico das nanopartículas de NPLA-ZnPc foram avaliados por experimentos *in vitro* usando cultura de células em monocamada com a linha celular de gliossarcoma 9 L/LacZ como modelo biológico.

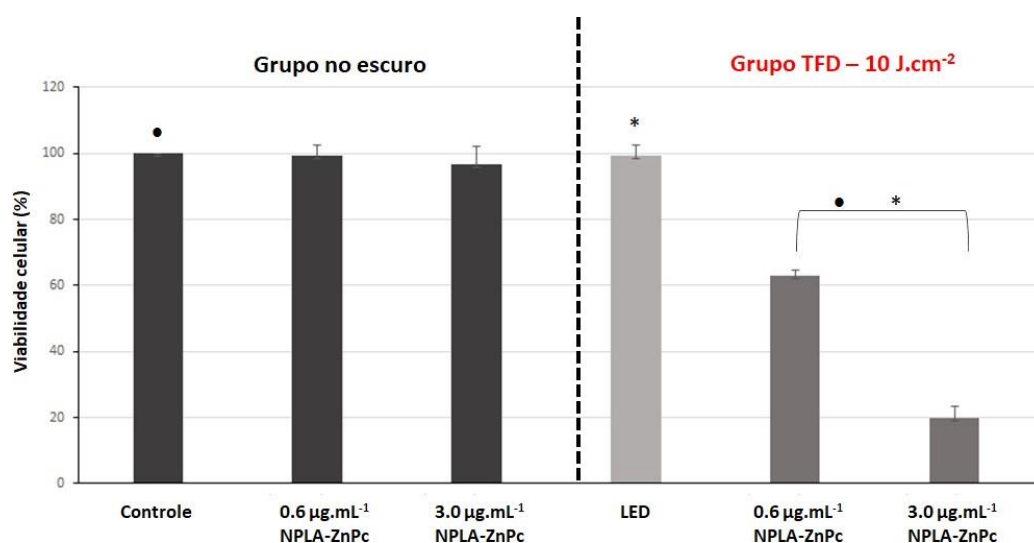
Os gliossarcomas são tumores cerebrais compostos por células de origem glial e mesenquimal (geralmente fibroblastos), o que os torna mais agressivo e invasivo. Considerado

o astrocitoma mais grave, apresenta a variante histopatológica dos glioblastomas HDI - Wild Type, anteriormente classificados como glioblastoma grau IV, correspondendo a 2% dos tumores cerebrais astrocíticos. (ZONG *et al.*, 2012; WALKER, *et al.*, 2011).

Um fotossensibilizador ideal deve ser atóxico na ausência de irradiação de luz, ter uma afinidade seletiva para células tumorais, ser quimicamente puro, bem como ter um acúmulo máximo nos tecidos tumorais em um curto espaço de tempo entre a administração e a ativação da luz laser (DE MELO *et al.*, 2020).

As nanopartículas, sem o fotossensibilizador, não foram tóxicas ao sistema celular, demonstrando a biocompatibilidade do sistema desenvolvido. Os dados da Figura 12, a seguir (grupo escuro), mostraram que as células tratadas com ZnPc encapsulado em nanopartículas de PLA não apresentaram toxicidade no escuro. Esses resultados corroboram aqueles previamente relatados na literatura para ZnPc nanoencapsulado. (GARCIA *et al.*, 2016; YU *et al.*, 2018).

Figura 12 - Análise da viabilidade da linha celular 9L/LacZ. 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: Elaborado pelo autor.

Nos experimentos de fototoxicidade, nossos resultados demonstram que a irradiação de LED NPLA-ZnPc (grupo PDT) induz a morte celular em células de 9 L/LacZ.

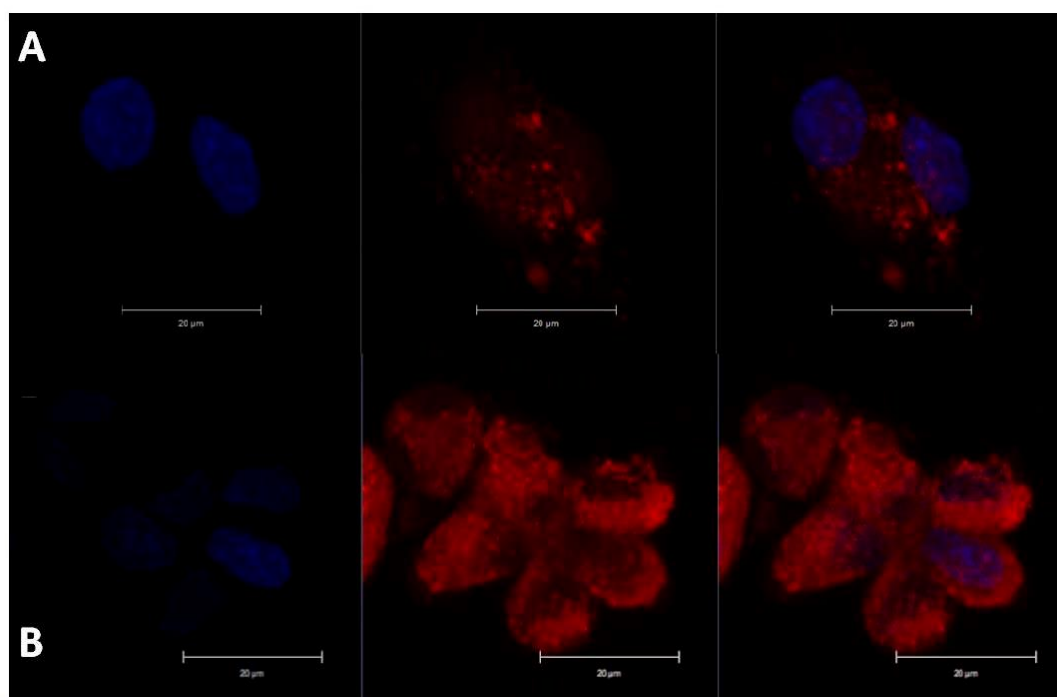
Com a presença de nanopartículas de PLA carregadas com ZnPc, uma diminuição significativa na viabilidade celular é observada. Ping e colaboradores (2016) descrevem a síntese e o efeito fotodinâmico de ZnPc carregado em nanopartículas de poli-L-lisina. Os

resultados indicam que uma pequena dosagem de nanofotossensibilizadores ( $36 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) pode causar fototoxicidade grave, que pode ocorrer devido ao baixo grau de agregação das moléculas de ZnPc, bem como sua localização específica nas organelas celulares (PING *et al.*, 2016).

### 5.7 LOCALIZAÇÃO INTRACELULAR

A microscopia confocal foi realizada para sustentar a entrega do alvo e a absorção celular de NPLA-ZnPc. A Figura. 13, a seguir, mostra a presença de ZnPc nanoencapsulada no citoplasma celular 1 h após a incubação.

Figura 13 - Imagens de microscopia confocal das células 9L/LacZ após 1 h de incubação com NPLA-ZnPc. Fluorescência azul: DAPI (marcação nuclear); Fluorescência vermelha: ZnPc ( $0.6$  e  $3.0 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ).



Fonte: Elaborado pelo autor.

Na localização das nanopartículas NPLA-ZnPc, o fotossensibilizador foi encontrado disperso no citoplasma, sem interação aparente com o núcleo da célula (Figura 13).

Da Silva Abe e colaboradores (2016) estudaram a internalização de ZnPc encapsulado em nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona por macrófagos peritoneais. Nanopartículas foram visualizadas dentro das células, sugerindo que elas passam através da membrana celular (DA SILVA ABE *et al.*, 2016).

O tipo de fotodano que ocorre nas células neoplásicas depende da localização subcelular do PS dentro da célula. Portanto, a localização citoplasmática impediu a localização nuclear do PS, mesmo quando encapsulado em nanopartículas, minimizando assim outros efeitos nas células saudáveis circundantes e danos ao DNA. (KRUGER *et al.*, 2018).

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas de PLA fabricadas pelo método de dupla emulsificação/evaporação do solvente para encapsular a zinco ftalocianina (ZnPc) como modelo de sistema de liberação para aplicações em Terapia Fotodinâmica (TFD), proposta como um procedimento terapêutico promissor minimamente invasivo que emprega os seguintes elementos essenciais para induzir a morte celular: um fotossensibilizador, luz de um comprimento de onda específico e oxigênio molecular.

Contudo, verificou-se que os fotossensibilizadores clássicos usados no protocolo de TFD apresentam algumas desvantagens que limitam sua aplicação clínica. Nesse sentido, o uso da nanotecnologia tem sido considerado, uma vez que fornece muitas ferramentas que podem ser aplicadas à TFD para contornar essas limitações, trazendo, assim, novas perspectivas.

Para desenvolvimento desta pesquisa, inicialmente, nanopartículas de poli (ácido láctico) (PLA) foram desenvolvidas para encapsular a zinco ftalocianina (ZnPc), um fotossensibilizador hidrofóbico, utilizado em TFD, a partir da aplicação do método de emulsificação dupla, para produzir nanopartículas de NPLA-ZnPc.

Essas nanopartículas de NPLA-ZnPc foram caracterizadas por medidas de estado estacionário, tamanho de partícula, potencial zeta, espalhamento dinâmico de luz, morfologia, eficiência de carregamento e liberação de fármaco. Na sequência, estudos *in vitro* foram realizados com e sem luz, conforme descrito pelos protocolos de TFD, utilizando células de gliossarcoma (9 L/LacZ) como modelo biológico, para avaliar o fotodano do fotossensibilizador quando incorporado na formulação polimérica.

Observou-se que o tamanho médio das nanopartículas apresentadas foi de  $384,7 \pm 84,2$  nm, com índice de polidispersidade (PDI) de  $0,150 \pm 0,015$  nm, e a eficiência de encapsulação foi de 83%. Além disso, as formulações de nanopartículas apresentaram valores de potencial zeta negativos ( $-27,5 \pm 1,0$  mV), o que explica sua estabilidade coloidal.

Foi observado também que o perfil do espectro de absorção mostrou que o fotossensibilizador carregado nas nanopartículas não sofre alteração em suas propriedades fotofísicas após o processo de encapsulamento.

Nessa perspectiva, um perfil de liberação sustentada ao longo de 168 h foi obtido, com um perfil de liberação de ZnPc bifásico e, conforme relatado, um efeito fototóxico *in vitro* na faixa de 80% foi observado em células de gliossarcoma 9 L/LacZ em doses de luz laser ( $10 \text{ J.cm}^{-2}$ ) com  $3,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de ZnPc. Desse modo, a ZnPc carregada nas nanopartículas poliméricas apresentou estabilidade física adequada, boas propriedades fotofísicas, perfil de

liberação sustentada e atividade *in vitro* adequada para ser considerada uma formulação promissora para TFD.

O desenvolvimento de nanopartículas de PLA encapsuladas com ZnPc foi relatado neste trabalho com uma análise físico-química e fotofísica detalhada das formulações de nanopartículas desenvolvidas. A metodologia de dupla emulsão foi adequada para incorporar a ZnPc em nanopartículas de PLA com uma distribuição de tamanho estreita.

As vantagens da incorporação da ZnPc foram esclarecidas nos estudos de liberação. NPLAZnPc foram capazes de reter ZnPc a liberação por mais de sete dias, o que resultou em um perfil de liberação sustentada. A fototoxicidade do NPLA-ZnPc foi suscetível a grandes danos após a irradiação, provavelmente levando a uma série de eventos desencadeados principalmente pela produção local de espécies reativas de oxigênio no ambiente celular.

Enfim, com base nos resultados obtidos, espera-se que a utilização de nanopartículas de PLA encapsuladas com ZnPc possa ser um adjuvante promissor no tratamento de neoplasias baseadas na aplicação de protocolos utilizando TFD, uma vez que este modelo de sistema de liberação para aplicações em TFD objetiva contribuir para o aprimoramento tecnológico e científico do país em área inovadora, além de possuir elevado potencial de impacto social.

## REFERÊNCIAS

- ALLISON, Ron R.; MOGHISSI, Keyvan. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24, 2013.
- ALLEN, T. M.; CULLIS, P. R. Drug delivery systems: entering the mainstream. **Science**. v. 303, p. 1818-1822, 2004.
- ALMEIDA, Andreia de Araujo. **Estudo comparativo da fototoxicidade das protoporfirinas IX endógena e sintética e seus fotoprodutos contra células malignas**. 2011, 78f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2011.
- ALVES, Juliana Machado da Silveira. **Preparação e avaliação de nanoesferas de PLGA (50: 50) contendo porfirinas anfífilas para uso em terapia fotodinâmica**. 2010. 99 p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/249157>>. Acesso em: 3 ago. 2021.
- BAGNATO, Vanderlei Salvador. **As Novas Técnicas Ópticas para as Áreas da Saúde**. São Paulo: Livraria da Física, 2008.
- BERTOLINI, Wagner Luiz Heleno Marcus. **A influência do D-limoneno como promotor de absorção de ácido 5-aminolevulínico para Terapia Fotodinâmica do câncer de pele: avaliação *in vitro* e *in vivo* da permeação e retenção cutâneas**. 2009, 73f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, 2009.
- BYUN, Youngjae *et al.* Formulation and characterization of  $\alpha$ -tocopherol loaded poly  $\epsilon$ -caprolactone (PCL) nanoparticles. **Lwt-food science and technology**, v. 44, n. 1, p. 24-28, 2011.
- CAIXETA, Bruno Pontes. **Síntese e caracterização de fotossensibilizadores baseados em ftalocianinas de Zn(II) assimétricas tipo A3B**. 2018. 142 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.te.2018.813>.
- CAMPOS, Izabella Maria Ferreira. **Preparo e caracterização de nanopartículas de PLGA para liberação de acetato de dexametasona**. 2013. xii, 118 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Escola de Engenharia. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/1843/BUBD-9HDHDH>>. Acesso em: 3 ago. 2021.
- CARVALHO, Filipa Baptista Neto Viegas de. **A terapêutica fotodinâmica nos tratamentos das lesões potencialmente malignas e cancro da cavidade oral**. 2015, 90f. Dissertação (Mestrado em Medicina Dentária) – Universidade Fernando Pessoa, 2015.
- CHONG, D. T. *et al.* Advances in fabricating double-emulsion droplets and their biomedical applications, **Microfluid. Nanofluid.**, v.19, p. 1071-1090, 2015.
- CONTO, Leilane Costa de. **Production of microcapsules containing fish oil omega-3 polyunsaturated fatty acid ethyl esters = Produção de microcápsulas contendo éster etílico de ácidos graxos polinsaturados ômega-3**

de óleo de peixe. 2012. 199 p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255088>>. Acesso em: 03 ago. 2021.

COSTA, Aline Isabella Saraiva; CHAVES, Marcelo Donizetti. Dor em pacientes oncológicos sob tratamento quimioterápico. **Rev. Dor.**, v. 13, n. 1, p. 45-49, mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1806-00132012000100008> .

DA SILVA ABE, Amanda Santos Franco *et al.* Ação antitumoral de zinco (II) ftalocianina em solução ou encapsulada em nanopartículas de poli- $\epsilon$ -caprolactona internalizada por macrófagos peritoneais. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology** , v. 7, n. 3, 2016.

DA VOLTA SOARES, Mariana *et al.* Nanostructured delivery system for zinc phthalocyanine: preparation, characterization, and phototoxicity study against human lung adenocarcinoma A549 cells. **International journal of nanomedicine**, v. 6, p. 227, 2011.

DE MELO, Maryanne Trafani; PIVA, Henrique Luis; TEDESCO, Antonio Claudio. Projeto de um novo sistema de entrega de drogas de proteína (PDDS) com compostos fotoativos como uma aplicação potencial no tratamento do câncer cerebral de glioblastoma. **Ciência e Engenharia de Materiais: C.**, v. 110, p. 110638, 2020.

DE SOUZA, Thalita FM *et al.* Photophysical and Photochemical Properties and Aggregation Behavior of Phthalocyanine and Naphthalocyanine Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 6, p. 1199-1209, 2018.

DURMUŞ, Mahmut; NYOKONG, Tebello. Synthesis, photophysical and photochemical properties of aryloxy tetra-substituted gallium and indium phthalocyanine derivatives. **Tetrahedron**, v. 63, n. 6, p. 1385-1394, 2007.

FERREIRA, Juliana. **Análise da necrose em tecidos normais fotossensibilizados pós terapia fotodinâmica-estudo in vivo**. 2003, 104f. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Universidade de São Paulo, 2003.

FRÖHLICH, Eleonore. Comparison of conventional and advanced *in vitro* models in the toxicity testing of nanoparticles. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n.2, p. 10911107, 2018.

FUJITA, A. K. L. *et al.* Corrigendum to “**Fluorescence evaluations for porphyrin formation during topical PDT using ALA and methyl-ALA mixtures in pig skin models**”. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 15, p. 236–244, 2016.

GARCIA, Angélica M. *et al.* Photodynamic performance of zinc phthalocyanine in HeLa cells: A comparison between DPCC liposomes and BSA as delivery systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 163, p. 385-390, 2016.

GOMES, Felisbela Margarida Silveira Miguel. **Tratamento do melanoma maligno cutâneo**. 2012. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) – Universidade do Porto, Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Porto, 2012.

GOMES, Graziela Veiga de Lara. **Produção por método da temperatura de inversão de fases, estudo de estabilidade físico-química, digestibilidade *in vitro* e citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas encapsulando beta-caroteno.** 2015, 137f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2015.

GRECCO, Clovis. **Estudo comparativo da terapia fotodinâmica utilizando laser CW e de femtossegundos em diferentes intensidades e comprimentos de onda.** 2013, 112f. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, 2013.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). Ana Beatriz Rocha Bernat, Daphne Rodrigues Pereira, Monica Marchese Swinerd (org.). Hospital do Câncer I. Seção de Psicologia. **Sofrimento psíquico do paciente oncológico: o que há de específico?** Rio de Janeiro: INCA, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Estimativa 2020:** incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019. Disponível em:  
<https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files/media/document/estimativa-2020incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2021.

IQBAL, M. *et al.*. **Preparation of biodegradable PCL particles via double emulsion evaporation method using ultrasound technique,** *Colloid Polym. Sci.* 293, 861-873, 2015.

ISSA, Maria Cláudia Almeida; MANELA-AZULAY, Mônica. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501511, 2010.

JAHNO, Vanusca Dalosto. **Síntese e caracterização do poli (L-ácido láctico) para uso como biomaterial.** 2005, 94f. Dissertação (Mestrado em Engenharia) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Rio Grande do Sul, 2005. Disponível em:  
<https://www.lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/6945/000492758.pdf>. Acesso em: 20 jan. 2021.

KAZMIRCZAK, Adria. **Contribuições da assistência farmacêutica para o paciente oncológico.** 2016, 22f. Trabalho de conclusão de Curso (Pós-Graduação em Oncologia). Disponível em:  
<https://bibliodigital.unijui.edu.br:8443/xmlui/bitstream/handle/123456789/3935/Adria%20Kazmirczak.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 20 jan. 2021.

KOLLURU, Lakshmi Prasanna *et al.* Formulation development of albumin based theragnostic nanoparticles as a potential delivery system for tumor targeting. **Journal of drug targeting**, v. 21, n. 1, p. 77-86, 2013.

KRUGER, Cherie Ann; ABRAHAMSE, Heidi. Utilização de sistemas de entrega de fármacos fotossensibilizadores de nanopartículas direcionados para o aprimoramento da terapia fotodinâmica. **Molecules**, v. 23, n. 10, 2018.

LEE, Jinhyun Hannah; YEO, Yoon. Liberação controlada de drogas de nanocarreadores farmacêuticos. **Ciência da engenharia química**, v. 125, p. 75-84, 2015.

LI, B. *et al.* Synergistic effects of whey protein-polysaccharide complexes on the controlled release of lipid-soluble and water-soluble vitamins in W1/O/W2 double emulsion systems. **Int. J. Food Sci. Technol.**, v. 47, p. 248-254, 2012.

LI, Xingshu *et al.* Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 379, p. 147-160, 2019.

LOPES, Carla Martins; LOBO, José Manuel Sousa Lobo; COSTA, Paulo. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v. 41, n. 2, jun. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1516-93322005000200003>.

MENDONÇA, J. M. C. **Terapia Fotodinâmica no Tratamento de Neoplasias**. 2016, 77f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Algarve - Faculdade de Ciências e Tecnologias, 2016.

MENEZES, P. F. C.; REQUENA, M. B.; BAGNATO, V. S. Optimization of photodynamic therapy using negative pressure. **Photomed. Laser Surg.**, v. 32, n. 5, 2014.

MONDAL, Dhananjay; BERA, Smritilekha. Porphyrins and phthalocyanines: promising molecules for light-triggered antibacterial nanoparticles. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 5, n. 3, p. 033002, 2014.

MONTIEL-EULEFI, E. *et al.* Cytotoxic Effect of Double Emulsion (W/O/W) CuSO<sub>4</sub> Loaded PLA Nanoparticles on MKN-45 Gastric Adenocarcinoma Cell Line. **International journal of morphology**, v. 32, n. 1, p. 61-69, 2014.

NOKES, B. *et al.* Aminolevulinic acid (ALA): photodynamic detection and potential therapeutic applications. In: **Journal of Surgical Research**, v. 181, n. 2, p. 262–271, 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jss.2013.02.002>.

OGAWA, Y. *et al.* A new technique to efficiently entrap leuprolide acetate into microcapsules of polylactic acid or copoly (lactic/glycolic) acid. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 36, n.3, p. 1095-1104, 1987.

OZOG, D. M. *et al.* Photodynamic Therapy: A Clinical Consensus Guide. **Dermatol. Surg.**, v. 42, p. 804–827, 2016.

PANHÓCA, V. H. *et al.* Oral Decontamination of Orthodontic Patients Using Photodynamic Therapy Mediated by Blue-Light Irradiation and Curcumin Associated with Sodium Dodecyl Sulfate. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 34, n. 9, p. 411–417, 2016.

PEREIRA, Mário Rui da Cunha. **Fotofísica de porfirinas e ftalocianinas em matrizes de TiO<sub>2</sub> preparadas pelo método de Sol-Gel**. 2004. 217 f. Tese (Doutorado em Ciências) Universidade do Minho, Braga, 2004.

Perussi, Janice Rodrigues. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Quím. Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>> Acesso em 4 ago. 2021. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>.

PING, Jian-tao *et al.* Synthesis and optimization of ZnPc-loaded biocompatible nanoparticles for efficient photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 25, p. 4482-4489, 2016.

PINTO, M. C. C. *et al.* Photodynamic Therapy with 5-Aminolevulinic Acid (ALA) in the Treatment of Acne: A Case Study. **Scientific Literature**, v. 1, n. 1, p. 1–5, 2017.

RAO, KSV Krishna *et al.* Novel chitosan-based pH-sensitive interpenetrating network microgels for the controlled release of cefadroxil. **Carbohydrate Polymers**, v. 66, n. 3, p. 333- 344, 2006.

RKEIN, A. M.; OZOG, D. M. **Photodynamic Therapy. Dermatologic Clinics**, v. 32, n. 3, p. 415–425, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.det.2014.03.009>.

RODRIGUES, P. G. *et al.* Assessment of ALA-induced PpIX production in porcine skin pretreated with microneedles. **J. Biophotonics**, v. 8, n. 9, p. 723–9, 2015.

RODRIGUES, P. G. S. *et al.* Microneedles rollers as a potential device to increase ALA diffusion and PpIX production: Evaluations by wide-field fluorescence imaging and fluorescence spectroscopy. **Progress in Biomedical Optics and Imaging - Proceedings of SPIE**, v. 8926, p. 892614–892617, 2014.

RUELA, André Luís Morais. **Partículas de polímeros de impressão molecular como sistemas para liberação controlada de fármacos**. 2015, 154f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Alfenas. Disponível em: <https://bdtd.unifalmg.edu.br:8443/bitstream/tede/908/5/Tese%20de%20Andr%C3%A9%20Lu%C3%ADs%20Morais%20Ruela.pdf>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SÁ, Lucas Torres Miranda. **Sistemas de liberação de fármacos particulados baseados em poliésteres obtidos por spray drying para via inalatória**. 2014. 62 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Instituto de Tecnologia em Fármacos/Farmanguinhos, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014.

SALVETTI, Marina de Góes *et al.* Prevalence of symptoms and quality of life of cancer patients. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 73, n. 2, p. e20180287, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0287> Acesso em 4 ago. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1590/0034-7167-2018-0287>.

SANTOS, Ana Paula dos. **Desenvolvimento e atividade antifúngica de nanopartículas de PLGA carregadas com o peptídeo crotalicidina [15-34]**. 2019. 61 f. Dissertação. (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2019.

SCHAFFAZICK, Scheila Rezende *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química nova**, v. 26, n. 5, p. 726-737, 2003.

SEMYACHKINA-GLUSHKOVSKAYA, Oxana *et al.* Photodynamic Opening of the Blood–Brain Barrier Using Different Photosensitizers in Mice. **Applied Sciences**, v. 10, n. 1, p. 33, 2020.

SETLIK, J.; SILVA, R. de C. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não melanoma. **Revista Saúde e Desenvolvimento**; v. 7, n. 4, p. 195-206, 2015.

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc (II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. **European journal of pharmaceutical sciences**, v. 23, n. 2, p. 131-138, 2004.

SILVA, A. P. *et al.* Fast elimination of onychomycosis by hematoporphyrin derivative-photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 10, n. 3, p. 328–330, 2013.

SILVA, Ludymila Rosa Batista. **Inativação fotodinâmica de *Saccharomyces cerevisiae* Utilizando Rosa de Bengala adsorvido em quitosana**. 2018. 38 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Química Industrial) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.

SILVA, Saulo Lucas Pereira da. **Produção fotoquímica de nanopartículas de prata estabilizadas por óxido de grafeno/polímero**. 2019. 61 f., il. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química Tecnológica) - Universidade de Brasília, Brasília, 2019.

SILVA, Z. S. *et al.* Animal models for photodynamic therapy (PDT). **Biosci. Rep.**, v. 35, p. 1– 14, 2015.

SIMPLICIO, Fernanda Ibanez; MAIONCHI, Florângela; HIOKA, Noboru. Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, 2002.

TOFFOLI, Daniel José. **Caracterização espectroscópica de complexos hipocrelina b: lantanídeos para uso em terapia fotodinâmica**. 2008, 110f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, São Paulo, 2008.

Disponível em:

[http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Daniel%20Jose%20Toffoli\\_M.pdf](http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/Daniel%20Jose%20Toffoli_M.pdf). Acesso em: 10 jan. 2021.

TRACZYNSKI, Marcos Rodrigo. **Desenvolvimento e avaliação de nanopartículas poliméricas de poli (metil metacrilato) (PMMA) como um sistema de liberação modificada**. 2016, 92f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Universidade Estadual de Maringá, 2016.

TSUBONE, Tayana M. *et al.* Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mixtures. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 5, p. 890-897, 2014.

VIANA, Osnir de Sa. **Desenvolvimentos de sistemas nanoestruturados à base de Quantum DOTS livres e associados a porfirinas para aplicação em terapia fotodinâmica**. 2015. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Recife, 2015

WALKER, C. *et al.* Biology, genetics and imaging of glial cell tumours. **The British journal of radiology**, v. 84, n. 2, p. S90-S106, 2011.

YU, Wei *et al.* Ftalocianina de zinco encapsulada em micelas de polímero como um potente fotossensibilizador para a terapia fotodinâmica de osteossarcoma.

**Nanomedicina: Nanotecnologia, Biologia e Medicina**, v. 14, n. 4, pág. 1099-1110, 2018.

ZONG, Hui; VERHAAK, Roel GW; CANOLL, Peter. The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements.

**Expert review of molecular diagnostics**, v. 12, n. 4, p. 383-394, 2012.

## ANEXO A - TRABALHO APRESENTADOS

Nosso grupo de pesquisa concentra-se na área de Síntese Orgânica sendo que um dos enfoques é centrado no desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoparticulados para aplicação em TFD.

O desenvolvimento da dissertação de mestrado possibilitou a apresentação de trabalho em congressos relacionados ao tópico proposto como temática da dissertação:

- SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA DE POLI (ÁCIDO LÁCTICO) POR DUPLA EMULSIFICAÇÃO PARA APLICAÇÃO EM FOTOPROCESSOS de autoria de **Benedito M. de Oliveira Junior**; Jéssica A. R. Ambrósio; Bruna C. dos Santos Pinto; Milton Beltrame Junior; Erika P. Gonçalves; Andreza R. Simioni, apresentado na forma de e-Pôster no *I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB)* organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e pela startup NanoDiversity no período de 01 a 04 de junho de 2020.