

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

Jéssica Aparecida Ribeiro Ambrosio

Nanosistemas de entrega de fármacos à base de hidrogel para Terapia Fotodinâmica

São José dos Campos
2022

Jéssica Aparecida Ribeiro Ambrosio

Nanosistemas de entrega de fármacos à base de hidrogel para terapia fotodinâmica

Defesa de Mestrado apresentada ao Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Processamento de Materiais

Orientadora: Prof^a Dr^a Andreza Ribeiro Simioni

Co- Orientador: Prof Dr Leandro José Raniero

São José dos Campos
2022

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Ambrosio, Jéssica Aparecida Ribeiro

Nanosistemas de entrega de fármacos à base de hidrogel para terapia fotodinâmica / Jéssica Aparecida Ribeiro Ambrosio; orientadora, Andreza Ribeiro Simioni; co-orientador Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2022.

1 CD-ROM, 53 p.

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

Inclui referências

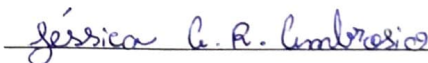
1. Processamento de Materiais. 2. cloro alumínio ftalocianina. 3. hidrogel. 4. terapia fotodinâmica . 5. xerogel. I. Simioni, Andreza Ribeiro, orient. II. Raniero, Leandro José, co-orient. III. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais. IV. Título.

Eu, Jéssica Aparecida Ribeiro Ambrosio, 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, 31 de Março de 2022.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 18 / 02 / 2022

JÉSSICA APARECIDA RIBEIRO AMBRÓSIO

“NANOSSISTEMAS DE ENTREGA DE FÁRMACOS À BASE DE HIDROGEL PARA TERAPIA FOTODINÂMICA”.

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

PROF.^ª DR.^ª ERIKA PETERSON GONÇALVES 

PROF.^ª DR.^ª ANDREZA RIBEIRO SIMIONI 

PROF. DR. LEANDRO JOSÉ RANIERO 

PROF.^ª DR.^ª IVONE REGINA DE OLIVEIRA 

PROF. DR. MARIGILSON PONTES DE SIQUEIRA MOURA – Univasf 

PROF. DR. THIAGO MARCELO RIBEIRO GIANETI – Ouro Fino Agrociência 

Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 18 de fevereiro 2022.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela minha vida, pela minha família, pelas bênçãos e oportunidades que eu tive ao longo da minha vida.

Aos meus pais, Sueli e Antônio pelo amor incondicional, suporte nesse passo tão importante para mim e minha carreira, e pelo exemplo diário. Muito obrigada por tudo que vocês fazem por mim, sem vocês nada disso seria possível.

As minhas tias Lúcia e Sônia pelo amor e apoio na busca desse sonho.

Aos demais familiares por sempre me apoiarem, por entenderem a minha ausência e pelo amor.

Aos meus amigos, família que escolhi ao longo da vida, obrigada pelas memórias que construímos juntos, pelas palavras de conforto e motivação de cada um, por todos os momentos de descontração em meio a correria da vida no laboratório, no meu coração tem um espaço especial dedicado a cada um, e vocês sabem.

A minha prima Amanda por seu meu suporte diário, mesmo de longe sempre preocupada com meus momentos de pausa, meu amparo nos dias em que o experimento não ia bem, sempre alegre com cada avanço que eu tive nessa jornada e pronta para me ouvir sempre.

A Vitória, amiga que todos os dias me inspira a ser alguém melhor, que acredita e apoia cada um dos meus sonhos (dos mais simples aos mais mirabolantes), ainda vamos conhecer o mundo e realizar muitos outros sonhos juntas.

A Bruna, amiga que a faculdade me deu, dupla de TCC e companhia de todas as horas nessa grande jornada que foi o mestrado, obrigada por me animar e por todo o crescimento que tivemos juntas.

A professora Andreza, minha orientadora que me acolheu no laboratório ainda na época da graduação e tornou possível toda a jornada dentro do laboratório e na vida acadêmica, obrigada pelo seu exemplo, carinho e cuidado comigo em todos esses anos.

Ao professor Leandro, meu coorientador, obrigada pelo apoio e por me mostrar como o conhecimento que adquirido em sala pode ser transformado para a vivência experimental.

A professora Erika pelas aulas, pelas oportunidades, companhia de bancada e de organização do laboratório, muito do meu crescimento acadêmico e pessoal se deve a nossa parceria.

Aos demais professores do laboratório: Milton e Denilson agradeço pela confiança e troca de experiências.

Aos amigos do laboratório, cada um, mesmo os que já encerraram o ciclo na instituição, contribuiu para o meu aprendizado e crescimento, eu não estaria aqui sem cada uma destas experiências e companheirismo.

Aos professores do PPGPM por todas as aulas, conselhos e momentos de conversa que tivemos ao longo dos dois anos de curso.

A professora Juliana por todo o auxílio com a cultura de células e os testes *in vitro*.
Aos colegas e funcionários da central multiusuário e do IP&D pelo auxílio e convivência.
A todos os funcionários da UNIVAP por possibilitarem o andamento da instituição e das nossas atividades.

A UNIVAP por toda a minha jornada escolar desde os 4 anos de idade, considero essa instituição minha segunda casa e serei eternamente grata por tudo.

VOA TIME!!!!

“Pois onde estiver o vosso tesouro, aí estará também o vosso coração”

Mateus 6:21

RESUMO

Os sistemas hidrogéis recebem cada vez mais visibilidade em inúmeras áreas envolvendo a biomedicina, a engenharia de tecidos, tratamentos ambientais e a liberação modificada de fármacos. Estes sistemas apresentam composição em rede tridimensional e alta capacidade de absorção de água, e são em sua maioria formados de materiais poliméricos, o que agrega características de biocompatibilidade aos mesmos, permitindo que se tornem uma opção como carreadores de fotossensibilizadores (FS) para aplicação em tratamentos envolvendo a Terapia Fotodinâmica (TFD). A TFD é uma técnica de tratamento que tem como base a administração de um FS, que na presença de luz em comprimento de onda adequado é excitado e transfere energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas (ROS), como o oxigênio singlete, que é capaz de causar a morte celular no alvo do tratamento. O objetivo do trabalho foi sintetizar um sistema xerogel, incorporado com Cloro Alumínio Ftalocianina (CIAIPc), para aplicação como sistema de liberação modificada (DDS) utilizando os protocolos da TFD. O xerogel foi sintetizado usando gelatina como polímero base pela técnica de reticulação química. A incorporação do fármaco foi realizada por imersão do xerogel em solução de CIAIPc $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$. A morfologia externa do xerogel foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foi avaliado o grau de intumescimento do sistema sintetizado para determinação do potencial de absorção de água. O sistema xerogel produzido foi caracterizado por técnicas térmicas, calorimétricas, fotoquímicas, fotofísicas e fotobiológicas. As imagens da análise de MEV apontaram a presença das redes tridimensionais na formulação. O teste de intumescimento demonstrou que o processo de secagem do sistema aumenta a sua capacidade de retenção de água. Todos os resultados espectroscópicos mostraram excelentes parâmetros fotofísicos e fotoquímicos do fármaco estudado quando veiculado no sistema xerogel. A eficiência de carregamento foi de 70 %. As curvas de TGA e DSC apresentaram comportamento semelhante ao da gelatina. Em células HeLa, TFD mediada por $0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ hidrogel – CIAIPc mostrou uma diminuição na sobrevivência próxima a 95%, demonstrando o efeito fotodinâmico ocasionado pela aplicação dos protocolos de TFD. Com base nos resultados obtidos, é esperado que a utilização de xerogel a base de gelatina veiculado com a CIAIPc possa ser um adjuvante promissor no tratamento de neoplasias baseadas na aplicação de protocolos da TFD, contribuindo para o desenvolvimento científico e tecnológico do país com potencial grau de inovação e impacto na sociedade.

Palavras-Chave: cloro alumínio ftalocianina; gelatina; hidrogel; terapia fotodinâmica e xerogel.

HYDROGEL-BASED DRUG DELIVERY NANOSYSTEMS FOR PHOTODYNAMIC THERAPY

ABSTRACT

Hydrogel systems receive increasing visibility in numerous areas involving biomedicine, tissue engineering, environmental treatments and modified drug delivery. These systems have a three-dimensional network composition and high water absorption capacity, and are mostly made of polymeric materials, which adds biocompatibility characteristics to them, allowing them to become an option as carriers of photosensitizers (PS) for application in treatments involving Photodynamic Therapy (PDT). PDT is a treatment technique that is based on the administration of a PS, which, in the presence of light at an appropriate wavelength, is excited and transfers energy to molecular oxygen, generating reactive species (ROS), such as singlet oxygen, which is capable of cause cell death in the treatment target. The objective of this work was to synthesize a xerogel system, incorporated with Chlorine Aluminum Phthalocyanine (ClAlPc), for application as a Drug delivery system (DDS) using PDT protocols. The xerogel was synthesized using gelatin as the base polymer by the chemical crosslinking technique. The incorporation of the drug was performed by immersion of the xerogel in a ClAlPc solution 1.0 mg.mL⁻¹. The external morphology of the xerogel was examined by scanning electron microscopy (SEM). The degree of swelling of the synthesized system was evaluated to determine the water absorption potential. The xerogel produced was characterized by thermal, calorimetric, photochemical, photophysical and photobiological techniques. The images from the SEM analysis showed the presence of three-dimensional networks in the formulation. The swelling test showed that the drying process of the system increases the water retention capacity. All spectroscopic results showed excellent photophysical and photochemical parameters of the drug studied when charged in the xerogel system. Charging efficiency was 70%. The TGA and DSC curves showed similar behavior to that of gelatin. In HeLa cells, PDT mediated by 0.5 mg.mL⁻¹ hydrogel – ClAlPc showed a decrease in survival close to 95%, demonstrating the photodynamic effect caused by the application of PDT protocols. Based on the results obtained, it is expected that the use of gelatin-based xerogel delivered with ClAlPc can be a promising adjuvant in the treatment of neoplasms based on the application of PDT protocols, contributing to the scientific and technological development of the country with potential degree. innovation and impact on society.

Keywords: chlorine aluminium phtalocyanine; gelatin; hydrogel; photodynamic therapy and xerogel.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Esquema de aplicação da TFD	16
Figura 2 - Mecanismo das reações do Tipo I e II.....	17
Figura 3 - Estrutura química da Cloro Alumínio Ftalocianina.....	19
Figura 4 - Representação de um sistema hidrogel.....	21
Figura 5 - Metodologia de síntese do hidrogel.....	26
Figura 6 - Metodologia de Síntese das amostras do Xerogel e Xerogel - CIAIPc	27
Figura 7 - Hidrogel após a síntese.....	32
Figura 8 - Xerogel (a) e xerogel adsorvido com CIAIPc (b).....	33
Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura do xerogel: (a) panorama da rede polimérica formada; (b) detalhamento da rede polimérica formada.	34
Figura 10 - Grau de intumescimento: a) Grupo A e b) Grupo B	36
Figura 11 - Curva comparativa CIAIPc livre e incorporada no xerogel.....	37
Figura 12 - a) Curva de calibração CIAIPc, b) Fit linear da concentração x Absorbância	38
Figura 13 - Termograma de DSC e TGA da amostra de xerogel.....	40
Figura 14 - Temperatura de transição vítrea da amostra de xerogel	41
Figura 15 - Espectro de FTIR das amostras de CIAIPc, gelatina, xerogel, xerogel - CIAIPc..	42
Figura 16 - Viabilidade celular (Teste de exclusão com azul de tripan).....	43
Figura 17 - Imagens de microscopia confocal das células Hela CCL-2 após 1 h de incubação com hidrogel - CIAIPc. Fluorescência azul: DAPI (marcação nuclear); Fluorescência vermelha: Imagens de microscopia confocal das células Hela CCL-2 após 1 h de incubação com hidrogel - CIAIPc.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Relação das amostras utilizadas em cada teste de caracterização.....	34
Tabela 2 - Média % GI.....	35
Tabela 3 - Relação de materiais utilizados na síntese e valores.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ANOVA – Análise de variância (fórmula estatística)
- CIAIPc – Cloro Alumínio Ftalocianina
- DAPI - 4',6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato
- DDS - Sistemas de liberação controlada (*Drug Delivery System*)
- DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (meio de cultura celular)
- DMSO - Dimetilsulfóxido
- DSC – Calorimetria Diferencial
- EC – Eficiência de carregamento do sistema
- FS - Fotossensibilizador
- GI – Grau de Intumescimento
- HRAN - Hospital Regional da Asa Norte
- Hidrogel - CIAIPc: Hidrogel carregado com CIAIPc
- MEV – Microscopia eletrônica de varredura
- PBS - Tampão fosfato-salino
- PVA – Poli (Álcool vinílico)
- ROS – Espécies reativas de oxigênio
- TFD – Terapia Fotodinâmica
- TGA - Termogravimetria
- UnB - Universidade de Brasília
- Unico - Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia
- UNIFESP - Universidade Federal de São Paulo
- USP - Universidade de São Paulo
- Xerogel – CIAIPc: xerogel carregado com Cloro Alumínio Ftalocianina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Terapia Fotodinâmica.....	16
2.2 Fotossensibilizadores.....	18
2.3 Sistemas se Liberação Modificada (DDS)	20
2.4 Sistemas Hidrogel.....	21
2.5 Sistemas Sol-Gel	22
2.6 O Tratamento do Câncer.....	23
3 OBJETIVOS	25
3.1 Objetivo Geral	25
3.2 Objetivos Específicos	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
4.1 Materiais	26
4.2 Síntese Do Hidrogel.....	26
4.3 Síntese Do Xerogel.....	27
4.4 Caracterização Morfológica Do Xerogel.....	27
4.5 Avaliação do Grau de Intumescimento (% GI).....	28
4.6 Estudos Espectroscopicos no UV-Visível	28
4.7 Determinação da Eficiência de Carregamento (% EC).....	28
4.8 Caracterização Térmica e Calorimétrica Do Xerogel	29
4.9 Estudos Espectroscópicos no Infravermelho	29
4.10 Culturas Celulares	29
4.11 Ensaio de Citotoxicidade No Escuro	29
4.12 Ensaio de Fotocitotoxicidade.....	30
4.13 Análise de viabilidade celular pelo Método de Exclusão do Azul de Tripán.....	30
4.14 Localização Intracelular de ClAlPc.....	31
4.15 Análise Estatística	31
4.16 Análise de Custos.....	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Síntese do Hidrogel e do Xerogel	32
5.2 Caracterização Morfológica	34
5.3 Avaliação do Grau de Intumescimento (% GI).....	35
5.4 Análises Espectroscópicas no UV-Vis.....	37
5.5 Eficiência de Carregamento de ClAlPc no Sistema	39

5.6 Caracterização Térmica e Calorimétrica Do Xerogel	39
5.7 Análises Espectroscópicas no Infravermelho	41
5.8 Teste de Exclusão e Viabilidade Celular por Azul de Tripán	42
5.9 Localização Intracelular	44
5.10 Análise De Custos	45
6 CONCLUSÃO	46
7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	47
REFERÊNCIAS	48

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma modalidade de tratamento que apresenta vantagens quando comparada a quimioterapia e radioterapia para o tratamento de neoplasias bem como outras enfermidades causadas por fungos e bactérias. A técnica se baseia em três pilares: luz em um comprimento de onda adequado, um fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular, capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) que ocasionam uma cascata de eventos oxidativos levando a morte celular (ASHKBAR *et al.*, 2020; CALIXTO *et al.*, 2016; FRADE *et al.*, 2018; YARAKI *et al.*, 2020).

As ftalocianinas são uma classe de fotossensibilizadores hidrofóbicos, que apresenta absorção em comprimentos de onda elevados no espectro eletromagnético (entre 650 e 750 nm) e alta capacidade de produção de espécies reativas de oxigênio, sendo estes parâmetros necessários para o uso em TFD. A Cloro Alumínio Ftalocianina (CIAIPC) apresenta propriedades fotoquímicas e fotofísicas favoráveis para o uso em TFD, com duas principais bandas de absorção, uma na região dos 340 nm e outra na região entre 600 e 710 nm. No entanto, devida a sua característica hidrofóbica não pode ser administrada de forma isolada no organismo (CALIXTO *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2018; CIEPLIK *et al.*, 2018).

Como uma das alternativas para o uso de FS com algumas propriedades limitantes como a hidrofobicidade surgiram os sistemas de liberação modificada (*drug delivery systems* - DDS). Estes sistemas são constituídos em sua maioria de polímeros que apresentam propriedades de biocompatibilidade e biodegradabilidade, e são usados para encapsular o FS de interesse. Dentre as classes de DDS podem-se citar nanopartículas, lipossomas e hidrogel (CALIXTO *et al.*, 2016; PAKULSKA *et al.*, 2016; ZHANG *et al.*, 2015).

A gelatina é um polímero derivado do colágeno que apresenta propriedades de biocompatibilidade, e capacidade de sofrer gelificação, o que a torna uma promissora candidata para o uso como base de um DDS para encapsulação de um FS em sistemas hidrogel (BAKRAVI *et al.*, 2018; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020).

Um sistema hidrogel é uma rede polimérica tridimensional capaz de absorver grandes quantidades de água, encapsular polímeros, apresentando muitas vezes resposta a estímulos externos como variações de pH e temperatura, podendo ser usados para DDS aplicados em TFD, na engenharia de tecidos e como parte integrante de tratamentos de água (CALIXTO *et al.*, 2016; FRADE *et al.*, 2018; FRACHINI; PETRI, 2019).

A nanotecnologia tem como base a emprego da nanociência (manipulação de materiais em escala nanométrica: 1 a 100 nm) para o desenvolvimento de novas técnicas e tecnologias.

Os mais antigos registros de seu uso são de Roma com o famoso copo de Licurgo e sua mudança de coloração, de acordo com a evolução natural da tecnologia e dos equipamentos muitos outros materiais foram descobertos e empregados no desenvolvimento de nanopartículas, nanossensores e sistemas de liberação controlada (BAYDA *et al.*, 2020).

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi desenvolver um sistema de xerogel a base de gelatina como modelo de sistema de liberação de fármacos e incorporar a CIAIPc como modelo de bioativo para aplicações em Terapia Fotodinâmica. A nanotecnologia focada no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos se apresenta como uma ciência multidisciplinar e busca contribuir com a capacitação científica, tecnológica e de inovação, contribuindo de maneira inovadora para o tratamento da saúde da humanidade.

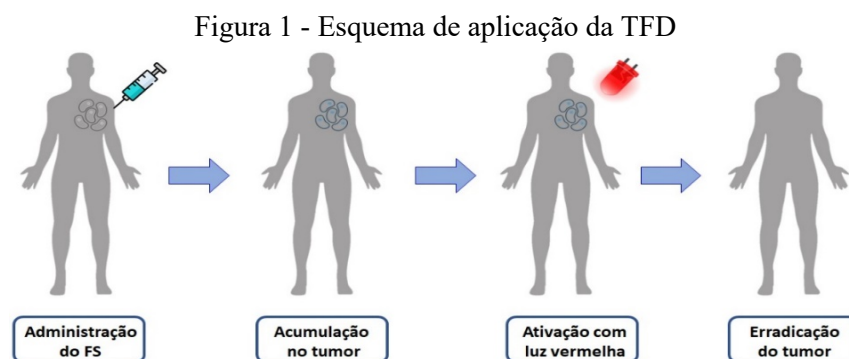
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Terapia Fotodinâmica

A TFD vem se desenvolvendo cada vez mais ao longo dos anos e sendo utilizada para tratar inúmeras doenças. Antes de seu estabelecimento como modelo terapêutico, antigas civilizações, como a chinesa e indiana já faziam o uso da luz solar e outros produtos para tratar doenças de pele como o Vítigo, a partir de um procedimento de aplicação de uma substância na região de interesse do tratamento e exposição ao sol (CIEPLIK *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2019).

Em 1900, Oscar Raab iniciou testes envolvendo acridina na tentativa de tratar *Paramecium spp.* Posteriormente, com a ajuda de Hermann Von Tappeiner, após a realização de vários testes observaram a relação entre a eficácia do tratamento, o tempo e a quantidade de luz envolvida. Na tentativa de tratar outras doenças de pele, mais tarde Albert Jesionek e Hermann Von Tappeiner foram os primeiros a descreverem a observação de um "Fenômeno Fotodinâmico". Em 1904 Hermann Von Tappeiner, Jodlbauer e Huber em 1905 conseguiram obter resultados positivos no tratamento de pacientes acometidos de doenças provenientes de bactérias utilizando os fenômenos fotodinâmicos (CIEPLIK *et al.*, 2018; OLIVEIRA *et al.*, 2015).

Com todos os avanços subsequentes hoje já se sabe a metodologia correta de aplicação da TFD em pacientes (Figura 1), desde o tempo de espera entre a administração do FS e a exposição do tumor (alvo do tratamento) a fonte de luz de comprimento adequado (a região entre 600 e 800 nm é conhecida como janela terapêutica e apresenta maior penetração no tecido alvo), bem como as preocupações com a oxigenação do tecido, que pode até ser "abastecida" de modo a maximizar a produção das espécies reativas e os efeitos da técnica (MAZZILLI *et al.*, 2020; SANTOS *et al.*, 2019).

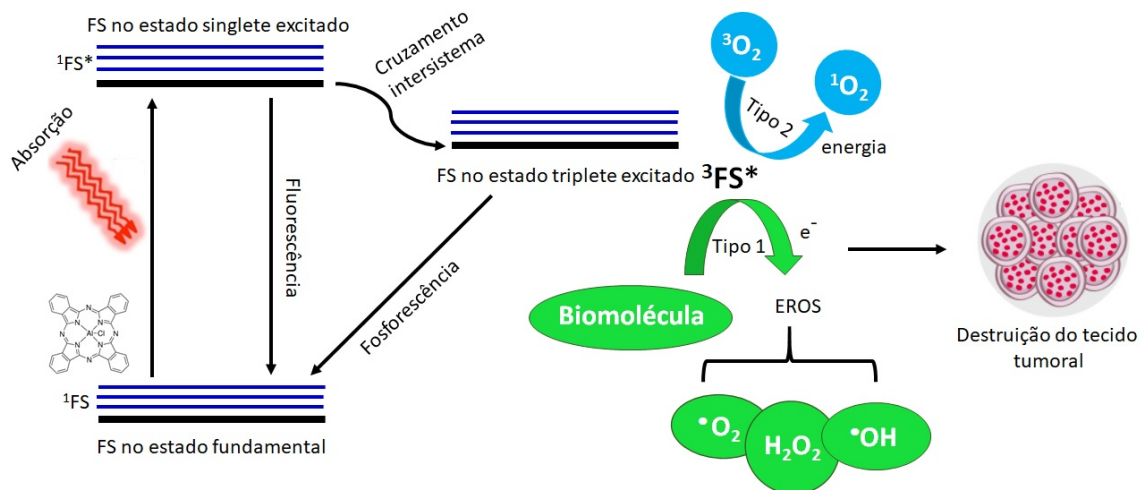


Fonte: O Autor.

As fontes de radiação utilizadas evoluíram muito, principalmente no que diz respeito ao seu alcance, não se limitando apenas a aplicação externa como no início de seus estudos. Hoje com os desenvolvimentos nanotecnológicos a fonte de luz pode ser levada e acionada dentro do tumor. Lâmpadas de Led e lasers vem sendo muito utilizadas devido ao seu baixo custo de manutenção e possibilidade de seleção de comprimento de onda, o que pode ajudar a maximizar a ação do FS. Lâmpadas de Tungstênio e Xenônio também são utilizadas (SANTOS *et al.*, 2019; WILSON, 2002).

A TFD tem como princípio básico a administração de um FS, que quando irradiado por uma fonte de luz é excitado liberando energia que reage com o oxigênio molecular, gerando espécies reativas que são responsáveis por uma série de eventos que culminam na morte celular do alvo do tratamento. No entanto, essa liberação de energia por parte do FS pode ocorrer por duas vias, e são conhecidas como Reações do tipo I e II (Figura 2) (MOHANTY; SENAPATI, 2017; SANTOS *et al.*, 2019).

Figura 2 - Mecanismo das reações do Tipo I e II



Fonte: O Autor.

Depois de excitado o FS pode retornar ao seu estado fundamental com duas probabilidades: manter a orientação do spin e emitir energia por fluorescência ou inverter a orientação do spin e se transformar em uma espécie triplete, emitindo energia por fosforescência. Nas reações do tipo I ocorre a transferência de elétrons do FS excitado resultando na formação de espécies de peróxidos. Já nas reações do tipo II o FS excitado transfere energia para o oxigênio, gerando o oxigênio singleto, o que faz com que a reação do tipo II seja uma das espécies apontadas como central para o sucesso da TFD (OLIVEIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019).

No ano de 1999, no Hospital Amaral de Carvalho em Jaú- SP iniciaram-se estudos clínicos com TFD para tratamento de alguns tipos de câncer como de pulmão e estômago, pela equipe supervisionada pelo Dr. Guilherme Cestari Filho. Juntamente ao desenvolvimento de diferentes fontes de luz laser. Já no ano 2000 Departamento de Dermatologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP iniciou os tratamentos de doenças de pele utilizando a TFD.

Entre os anos de 2006 e 2007 iniciaram-se tratamentos de câncer de boca e pele no Hospital Regional da Asa Norte (HRAN) em colaboração com a USP (Grupo de pesquisa em Fotobiologia e Fotomedicina da FFCLRP) e a UnB (Universidade de Brasília), além da inauguração do Ambulatório de Terapia Fotodinâmica, na Unidade de Cosmiatria, Cirurgia e Oncologia (Unico), parceira ao Departamento de Dermatologia da UNIFESP (Universidade Federal de São Paulo).

2.2 Fotossensibilizadores

Os FS são parte essencial nos tratamentos que tem como base o uso de TFD, uma vez que, quando utilizados com uma fonte de luz e oxigênio são capazes de realizar conversões de natureza energética, tornando a energia de natureza luminosa em reativa para as espécies de oxigênio (MUEHLMANN *et al.*, 2015).

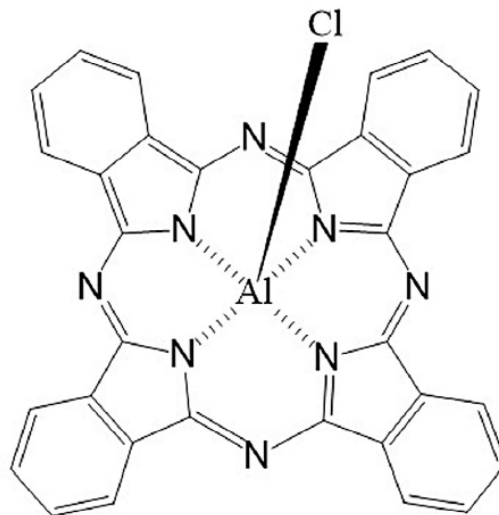
Analisando a linha do tempo do desenvolvimento dos FS durante a história observa-se que o primeiro FS aceito para uso em TFD foi o Photofrin®, que junto com outros derivados de porfirinas constitui a primeira geração de fotossensibilizadores, que apresenta diferenças estruturais entre si, baixas bandas de absorção na região do vermelho do espectro, o que resulta em pequenas taxas de penetração no tecido e consequentemente baixa eficiência do tratamento por TFD e baixa sensibilidade a luz (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019).

Na tentativa de melhorar as propriedades dos FS de primeira geração surgiu uma nova classe de FS chamada de FS de segunda geração, constituída principalmente de ftalocianinas, clorinas e derivados das porfirinas, já apresentando melhorias no seu espectro de absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético e consequentemente de eficácia no tratamento de TFD (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; OLIVEIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2019).

Dentre as características principais que devem ser apresentadas por um FS para sua aplicação em TFD podem se citar: solubilidade, seletividade, absorção de luz na região do vermelho do espectro, baixa toxicidade e ausência de reatividade no escuro. Tais propriedades podem ser encontradas em diversos FS como: Azul de Metileno, Curcumina e Ftalocianinas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016; CALIXTO *et al.*, 2016; DHARMARATNE *et al.*, 2020).

A Cloro alumínio Ftalocianina (ClAlPc – Figura 3) apresenta as propriedades favoráveis do seu grupo de compostos e estudos demonstram o seu grande potencial de tratamento para doenças pigmentadas, bem como o seu potencial como FS para TFD e ação fotodinâmica anticâncer (CARVALHO *et al.*, 2018; GOTO; MOURA; TEDESCO, 2017; MUEHLMANN *et al.*, 2015).

Figura 3 - Estrutura química da Cloro Alumínio Ftalocianina



Fonte: Carvalho., et al, 2018.

Na ClAlPc o metal central é o Al^{3+} , conferindo ao composto o comportamento diamagnético, que é capaz de, por exemplo aumentar os níveis de oxigênio singleto produzidos e o tempo de vida útil do estado tripleto (CARVALHO *et al.*, 2018; GOTO; MOURA; TEDESCO, 2017; SIQUEIRA-MOURA *et al.*, 2013).

As ftalocianinas, no geral, apresentam comportamento hidrofóbico, o que faz com que as mesmas se aglomerem quando em meio aquoso (ambiente fisiológico), por influência eletrônica dos anéis presentes nas moléculas, dificultando o seu uso como FS isolado. Na tentativa de resolver essa questão as ftalocianinas podem ser incorporadas em diversos tipos de sistemas, como nanopartículas, lipossomas e hidrogel, possibilitando a sua administração

endovenosa e posterior liberação deste fotossensibilizante para uso na TFD (CALIXTO *et al.*, 2016; CARVALHO *et al.*, 2018; GOTO; MOURA; TEDESCO, 2017).

2.3 Sistemas de Liberação Modificada (DDS)

Os sistemas de liberação modificada (*Drug Delivery System* – DDS) são uma alternativa derivada dos avanços da nanociência para possibilitar a entrega de fotossensibilizadores ou medicamentos ao seu alvo, mesmo em ambientes que apresentam condições desfavoráveis ao mesmo, possibilitando por exemplo a presença de um FS hidrofóbico em meio aquoso sem sofrer aglomerações (CALIXTO *et al.*, 2016; DUAN *et al.*, 2020).

Existem atualmente inúmeros sistemas base para um DDS, podendo ser nanopartículas de ouro, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de óxido de ferro, hidrogel, etc. Para a escolha do sistema base para se encapsular um FS deve se levar em conta as propriedades físicas e químicas dos componentes do sistema, bem como da sua afinidade com o FS utilizado. (CALIXTO *et al.*, 2016; DUAN *et al.*, 2020; SCICLUNA; VELLA-ZARB, 2020).

Quando usados como a base de um DDS, alguns materiais podem trazer sistema componentes de biodegradabilidade, biocompatibilidade e bioadesão. Como exemplos podem - se citar a quitosana, presente no exoesqueleto de crustáceos, podendo também aumentar a resistência mecânica do DDS, a hidroxiapatita, muito utilizada devida a sua compatibilidade com a estrutura óssea humana, e do Poli (Álcool vinílico) (PVA), um polímero sintético, biodegradável e que apresenta boas características e aptidão para a formação de filmes (FRADE *et al.*, 2018; KAVOOSI *et al.*, 2017; RIVAS *et al.*, 2019).

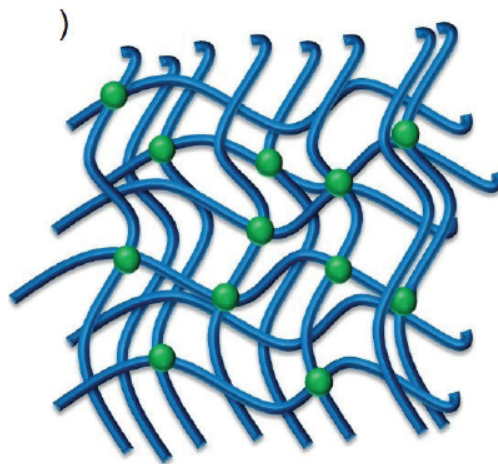
A gelatina é um resultado da hidrólise do colágeno sendo, portanto, um biopolímero natural, com propriedades de biocompatibilidade, multifuncionalidade e baixo custo, o que explica o seu uso em diversas aplicações farmacêuticas e industriais (LI *et al.*, 2020; SCICLUNA; VELLA-ZARB, 2020).

A gelatina também apresenta capacidade de alteração de sua fase líquida para sólida no processo conhecido como gelificação, a partir de mudanças na temperatura do ambiente, bem como capacidade de formar filmes. A junção de tais propriedades faz com que a gelatina seja cada vez mais usada como base para o desenvolvimento de diversos sistemas de liberação como os nanohidrogéis (BAKRAVI *et al.*, 2018; CARVALHO *et al.*, 2018; FRACHINI; PETRI, 2019; HU *et al.*, 2019; KAVOOSI *et al.*, 2017; RIVAS *et al.*, 2019).

2.4 Sistemas Hidrogel

Um sistema hidrogel é constituído a partir de uma rede tridimensional (Figura 4), que muitas das vezes é formada por polímeros, apresenta propriedades hidrofílicas e alta capacidade de absorção de água, chegando em alguns casos a absorver até mil vezes o peso do sistema. Além destas características alguns desses sistemas apresentam respostas as características do ambiente, como mudanças de pH e temperatura (CHAI; JIAO; YU, 2017; FRACHINI; PETRI, 2019; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020).

Figura 4 - Representação de um sistema hidrogel



Fonte: Frachini e Petri, 2019.

Assim como os materiais poliméricos, os sistemas de hidrogel podem ser classificados quanto aos monômeros usados em sua formação como homopolímero (apenas um monômero) ou copolímero (formado por dois ou mais monômeros). Estes sistemas também podem ser classificados de acordo com a sua metodologia de preparação, podendo ser formados a partir de *crosslinking* (químico ou físico) (FRACHINI; PETRI, 2019; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020).

A partir dos processos de *crosslinking* químico podem ser formados sistemas de hidrogel a partir de diversos métodos como condensação e reação enzimática. Para isso são usados como agentes reticulantes diversas moléculas multi-funcionais como o glutaraldeído, formaldeído, glioxal e ácido bórico. O glutaraldeído, por exemplo, é apontado como um bom agente reticulante para sistemas compostos de gelatina, uma vez que é capaz desse ligar com grupos reativos da cadeia, melhorando a estabilidade da formulação e melhorando as condições de formação do filme polimérico (CARVALHO; GROSSO, 2006; FRACHINI; PETRI, 2019).

Já para os processos de *crosslinking* físico são caracterizados pela presença de ligações fracas como ligação de hidrogênio e forças de Van der Waals. Com base nesses processos podem-se formar hidrogéis a partir de processos de aquecimento ou gelificação dos monômeros, exemplo que pode ser observado no preparo caseiro da gelatina adequada para consumo. Existe também a possibilidade de formação de filmes de hidrogel por interação eletrostática, uma vez que polímeros carregados podem se combinar com outras espécies carregadas e sofrerem o processo de reticulação (FRACHINI; PETRI, 2019; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020).

Além de serem usados como DDS, os sistemas hidrogel apresentam uma enorme versatilidade, atuando desde a engenharia de tecidos até em componentes de sistemas de filtração. Rungsima et al (2020) produziu um sistema hidrogel encapsulado com bromotimol capaz de atuar como sensor de pH. Zhou et al (2019) desenvolveu um hidrogel capaz de absorver radiação solar e ser usado em processos de purificação de água (FRACHINI; PETRI, 2019; RUNGSIMA et.al, 2020; ZHOU et al., 2019).

Assim como muitas áreas da ciência, o desenvolvimento de hidrogéis também vem se beneficiando dos avanços obtidos com a difusão do uso das impressoras 3D, sendo muitas vezes utilizada para desenvolvimentos na área da engenharia de tecidos, aliando a capacidade de precisão das impressoras e as características de biocompatibilidade encontrada em materiais como a hidroxiapatita e a gelatina (UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020; WANG et al., 2019).

2.5 Sistemas Sol-Gel

O processamento de materiais poliméricos e de algumas cerâmicas pode ser feito a partir da metodologia Sol-Gel. A síntese ocorre a partir da mudança do estado “Sol” (suspensão coloidal resultante da hidrólise ou condensação de precursores) para o estado “Gel” (Estrutura rígida, coloidal ou polimérica) (ALFAYA; KUBOTA, 2002; DANKS; HALL; SCHNEPP, 2016).

Para que um polímero possa ser usado na preparação de um sistema Sol-Gel é importante que o mesmo seja capaz de se dissolver preferencialmente em água, fato que favorece o uso de polímeros naturais como a gelatina, que se dissolve em água a 40 °C (DANKS; HALL; SCHNEPP, 2016).

O fato de ser produzida a partir de um polímero natural classifica a gelatina como um biopolímero, que se adequa as definições necessárias para a configuração de um sistema

“Sol”, que pode alternar para a configuração de “Gel” a partir da diminuição da temperatura ou da adição de íons metálicos (DANKS; HALL; SCHNEPP, 2016; UNAGOLLA; JAYASURIYA, 2020).

A formação de redes 3D, que caracterizam um sistema hidrogel é feita a partir de ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas que acontecem nas moléculas do sistema. Já o processo de gelificação de um sistema produzido com base em biopolímeros ocorre com base nas transições Sol-Gel que estes sistemas podem sofrer (KAROYO; WILSON, 2017).

Inicialmente a conformação dos sistemas é de bobina, evoluindo para um estado de hélice ordenado até a formação das características redes. A conformação de “Gel” polimérico permite a retenção de líquidos em seu meio, fato que explica a propriedade de intumescimento, também característica de um sistema hidrogel (ALFAYA; KUBOTA, 2002; KAROYO; WILSON, 2017).

Os processos de secagem durante a rota de síntese Sol-Gel levam influenciam as propriedades do material resultante, e possibilitam uma nova classificação para os sistemas formados, dividida entre xerogel (obtido através do processo de evaporação do solvente), aerogel (obtido através de extração do solvente) e criogel (obtido através da retirada do solvente pelo processo de liofilização) (HE et al., 2021; GROULT; BUWALDA; BUDTOVA, 2021).

Porém, o desenvolvimento de xerogéis baseados em gelatina pelo método de reticulação química para o carregamento de bioativos em TFD tem recebido pouca atenção pela comunidade acadêmica.

2.6 O Tratamento do Câncer

O câncer figura como uma das doenças de maior problemática no mundo, podendo aparecer sob diversas variáveis como: câncer de mama, esôfago, próstata, etc. A identificação da doença ainda é um dos maiores obstáculos a se enfrentar, pois mesmo com os avanços tecnológicos o diagnóstico varia de acordo com o tipo da doença e o perfil do paciente. (CALIXTO et al., 2016, LI; KUMACHEVA, 2018, SANTOS et al., 2019).

Dentre os tratamentos mais conhecidos para a doença podem-se citar a cirurgia (que muitas das vezes não resulta na remoção total do tumor), a quimioterapia e a radioterapia, que são muitas vezes aplicados em conjunto, e embora apresentem eficiência no tratamento causam uma gama de efeitos colaterais nos pacientes, como: náuseas, queda de cabelo, má

nutrição, etc. (MOHANTY; SENAPATI, 2017; SANTOS et al., 2019; SAWADA et al., 2009).

O câncer de pele não melanoma é uma das variáveis do câncer com maior número de diagnósticos, apresentando muitas vezes uma grande capacidade de sofrer o processo de metástase. Tal efeito figura como uma das características que dificultam o tratamento de muitos tipos de cânceres, uma vez que durante a metástase o tumor pode se espalhar em grande velocidade para outros órgãos que inicialmente não tinham sido afetados, dificultando também a aplicação de tratamentos (DIDONA et al., 2018, LI; KUMACHEVA, 2018).

Com o advento da nanotecnologia e a possibilidade da realização de estudos *in vitro* e *in vivo*, surgiram inúmeras alternativas para tratamento de câncer envolvendo DDS com base em FS como azul de metileno e derivados de clorinas, para aplicação envolvendo TFD, que muitas das vezes é utilizada como complementar a quimioterapia ou a radioterapia (CALIXTO, et al., 2016, SHANMUGAPRIYA et al., 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo desenvolver um sistema xerogel incorporado com CIAIPc para uso como sistema de liberação modificada do FS e aplicação em TFD.

3.2 Objetivos Específicos

- Sintetizar o xerogel pelo método de reticulação química;
- Incorporar a CIAIPc como FS ativo em TFD;
- Avaliar a morfologia do sistema com a técnica de microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Caracterizar o sistema através das técnicas de espectroscopia no UV-Vis e espectroscopia no infravermelho;
- Avaliar o comportamento térmico e calorimétrico do sistema;
- Calcular da eficiência de carregamento (EC) da CIAIPc no sistema;
- Avaliar o grau de intumescimento (GI) do sistema;
- Avaliar a citotoxicidade e fototoxicidade *in vitro* do sistema de xerogel;
- Analisar a localização intracelular *in vitro* para o sistema xerogel.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Toda a atividade experimental descrita nos procedimentos abaixo foi realizada nas dependências do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento (IP&D), localizado na Universidade do Vale do Paraíba, em São José dos Campos, SP.

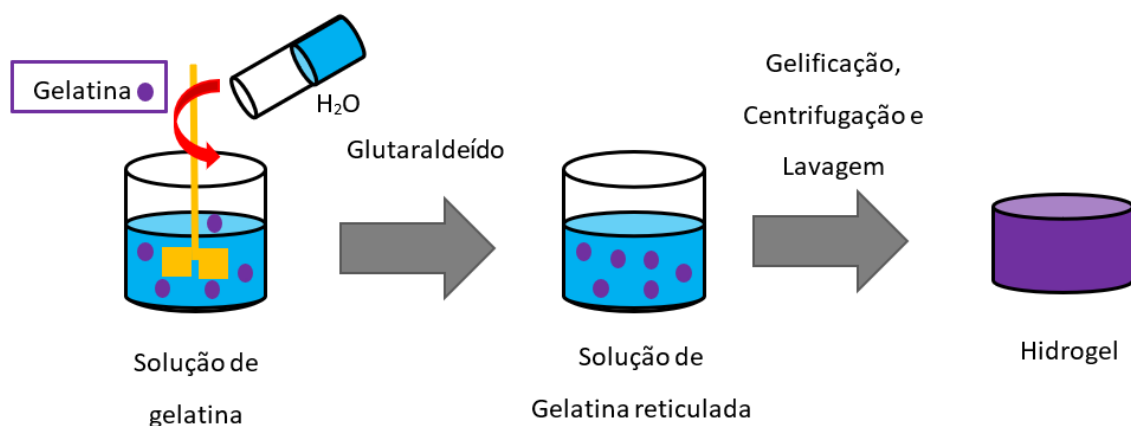
4.1 Materiais

- Gelatina (Gelatin Porcine Skin Type A Sigma G-2500): Sigma Aldrich
- Cloro Alumínio ftalocianina: Acros Organics
- Glutaraldeído: Dinâmica, Química contemporânea Ltda.
- Dimetilsulfóxido (DMSO): Dinâmica, Química contemporânea Ltda
- Álcool etílico: Dinâmica, Química contemporânea Ltda

4.2 Síntese Do Hidrogel

A metodologia de preparação do hidrogel a partir do método de reticulação química foi baseada na metodologia descrita por Bakravi et al (2018) com pequenas alterações baseadas em Frachini e Petri (2019) (Figura 5). Dissolveu-se a gelatina em 100 mL de água deionizada sob constante agitação e aquecimento a 40 °C. Posteriormente, foi adicionado o agente reticulante glutaraldeído e a amostra foi gelificada a temperatura ambiente, permanecendo em descanso na mesma temperatura por 24 h e posteriormente foi encaminhada para ciclos de centrifugação a 4500 rpm e lavagem com água deionizada para a remoção de impurezas.

Figura 5 - Metodologia de síntese do hidrogel.

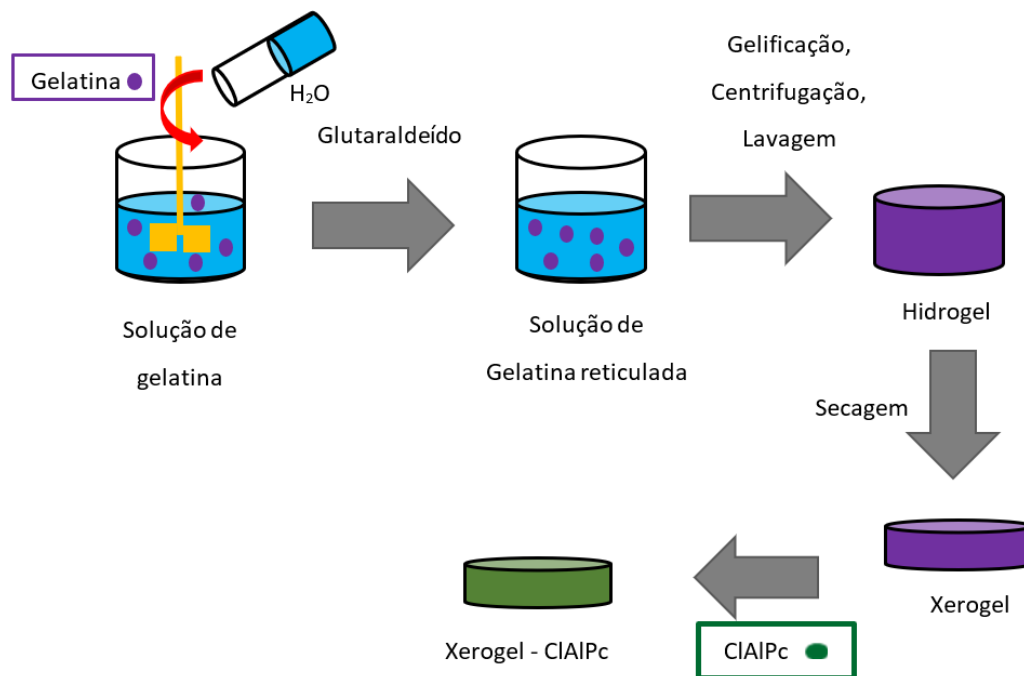


Fonte: O Autor

4.3 Síntese Do Xerogel

A base utilizada para a síntese do xerogel (Figura 6) foi a mesma utilizada para a síntese do hidrogel, descrita acima no item 4.2. Após os processos de centrifugação e lavagem a amostra foi seca, em um processo que consistiu no congelamento da amostra com N_2 e posterior sublimação da água existente na cadeia polimérica, utilizando o equipamento eppendorf Concentrator 5301 (Eppendorf AG 22331 Hamburg, Alemanha) e a CIAIPc (dissolvida em solução alcoólica de DMSO) foi incorporada por adsorção ao sistema.

Figura 6 - Metodologia de Síntese das amostras do Xerogel e Xerogel - CIAIPc



Fonte: O Autor

4.4 Caracterização Morfológica Do Xerogel

A morfologia externa do xerogel foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), a partir do equipamento EVO-MA10 (Zeiss, Alemanha). As amostras foram recobertas com Au para a obtenção das imagens. Tal análise permitiu a avaliação da morfologia da rede formada na síntese do sistema xerogel e seus padrões de distribuição nas amostras analisadas.

4.5 Avaliação do Grau de Intumescimento (% GI)

Por conta de suas redes tridimensionais os sistemas de hidrogel/ xerogel tem a capacidade de absorver água sem perder as suas propriedades químicas e estruturais. O tratamento das amostras para o ensaio foi feito com base na metodologia descrita por Kavooosi et al (2017). Inicialmente as amostras foram pesadas, imersas em água deionizada por um período pré-estabelecido, secas a partir de prensagem em papel absorvente e pesadas novamente. Todos os testes foram feitos em triplicata (equação 1).

$$\% \text{ GI} = (\text{Massa do sistema intumescido} - \text{Massa inicial}) / (\text{Massa inicial}) \times 100 \quad (1)$$

4.6 Estudos Espectroscópicos no UV-Visível

As leituras foram feitas com o espectrofotômetro Cary 50 e a análise dos dados permitiu a investigação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário da CIAIPc carregada no xerogel, bem como da CIAIPc na ausência do sistema, dissolvida em meio alcoólico. Estas análises permitiram averiguar se ocorreram alterações no perfil espectral do composto bioativo quando veiculados ao sistema de carregamento, além da determinação da curva de calibração para a CIAIPc em diferentes concentrações.

4.7 Determinação da Eficiência de Carregamento (% EC)

A eficiência de carregamento relaciona a quantidade de fármaco incorporado com o total de fármaco que foi utilizado durante o processo de síntese.

Para essa determinação, após o processo de centrifugação na etapa de síntese, o sobrenadante foi avaliado por espectroscopia de absorção na região do UV-vis para quantificar o fotossensibilizador adsorvido no sistema. Essa leitura foi realizada utilizando o comprimento de absorção máxima para a CIAIPc ($\lambda_{\text{max}} = 672 \text{ nm}$).

A eficiência de carregamento foi calculada (equação 2) seguindo a metodologia descrita por Lin et al (2019).

$$\% \text{ EC} = [\text{Peso experimental (CIAIPc)} / \text{Peso teórico (CIAIPc)}] \times 100 \quad (2)$$

4.8 Caracterização Térmica e Calorimétrica Do Xerogel

A técnica de termogravimetria (TGA) permite a avaliação da perda de massa do sistema em função da temperatura a qual a amostra é exposta, pode ser usada para definir a composição ideal do sistema em diferentes temperaturas. A técnica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), permite a avaliação de características intrínsecas dos materiais componentes do sistema estudado, bem como o seu comportamento em diferentes faixas de temperatura. Ambas as leituras trazem informações importantes acerca da estabilidade e perfil de perda de massa do sistema nas temperaturas de síntese e de armazenamento. Para a realização do ensaio cerca de 10 mg da amostra de xerogel (antes da incorporação da CIAIPc), foi utilizada nas leituras com uma programação de temperatura de 10 K.min⁻¹ (-263, 15 °C) na faixa de temperatura entre 293,15 K (20 °C) e 1273,15 K (1000 °C) sob um fluxo constante de nitrogênio, o equipamento utilizado foi o STA 449 F3 Jupiter®, NETZSCH.

4.9 Estudos Espectroscópicos no Infravermelho

Os espectros de absorção no infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 450 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹, no modo transmissão, com 32 varreduras com temperatura controlada em 20 °C. O espectrofotômetro utilizado foi o Spectrum 400 com Transformada de Fourier (FT-IR), tecnologia de refletância total atenuada (ATR) da fabricante PerkinElmer. Foram realizadas leituras das amostras de CIAIPc, gelatina, xerogel e xerogel - CIAIPc para comparações posteriores.

4.10 Culturas Celulares

Células da linhagem Hela CCL-2, adenocarcinoma, foram cultivadas em DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado com 10 % de FBS e 1 % de Penicilina/Estreptomicina solução e mantida em estufa a 37 °C com 5 % de CO₂.

4.11 Ensaio de Citotoxicidade No Escuro

Todos os testes foram realizados em triplicata em placas de 96 poços, e a concentração celular foi 1×10⁴ células por poço. Para os testes com CIAIPc incorporada ao hidrogel, foram aplicados com as concentrações de 0,1 µmol.L⁻¹, 0,5 µmol.L⁻¹ e incubados por 1h em câmara

de crescimento a 37 °C. Após o tempo de incubação, o meio com hidrogel - CIAIPc foi retirado e foi adicionado a 200 µl de PBS em cada poço. Os grupos escuros foram mantidos no escuro e os grupos irradiados foram submetidos à exposição à luz na biotabela. Depois de irradiação, o PBS foi retirado de todos os grupos, substituído por um meio fresco, e mantida a 37 °C por 18 h, antes dos ensaios do azul de tripan.

4.12 Ensaio de Fotocitotoxicidade

O dispositivo LED (Biopdi/IRRAD-LED 660 nm) utilizado nos experimentos de TFD é composto por 54 LEDs, sendo que cada LED apresenta potência de 70 mW, emitindo em 660 ± 5 nm e cobrindo uma área de 150 cm². A intensidade utilizada foi de 25 mW.cm⁻², e o tempo de exposição foi de 6 min e 40 s, totalizando a densidade de energia de 10 J.cm⁻². A intensidade foi encontrada seguindo a equação 3:

$$(54 \times 70) / A = I \quad (3)$$

e a fluência foi encontrada seguindo a equação 4:

$$I (\text{L.cm}^{-2}) \times t (\text{s}) = F (\text{J.cm}^{-2}) \quad (4)$$

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

4.13 Análise de viabilidade celular pelo Método de Exclusão do Azul de Tripan

O teste de exclusão do azul de tripan é uma técnica usada para avaliar o número de células vivas e mortas após um determinado tratamento. Baseia-se fundamentalmente na capacidade (presente nas células vivas) de expelir o corante usado, enquanto as células mortas, devida a perda de sua propriedade seletiva de membrana, tendem a acumular o composto no ambiente intracelular. Para este teste, as células foram transferidas para uma placa de 96 poços a uma densidade de 1×10^4 células por poço. Depois de 24 h de adesão celular, o sistema hidrogel - CIAIPc foi adicionado nas concentrações escolhidas e incubado por 1 h em um forno. Após esse período, o hidrogel - CIAIPc foi removido, e meio completo fresco foi adicionado. Uma placa foi mantida no escuro e a outra foi irradiada usando um dispositivo baseado em 48 LEDs, Biotable Irrad/LED660 (Biopdi), com irradiância de 25 mW.cm⁻², e uma fluência de 10 J.cm⁻², com comprimento de onda de 660 nm. A interação com o corante azul de tripan foi realizada 18 h após a aplicação da TFD. Após esse período, o

meio foi retirado dos poços e 50 µL de solução de azul de tripan 0,2 % foi adicionada e depois incubada por cinco minutos. Na sequência, a solução foi removida e PBS foi adicionado. Em seguida, os grupos foram avaliados contando o número de células vivas e mortas em 5 campos aleatórios para cada poço, por imagens obtidas usando o microscópio invertido (Zeiss Axio Vert A1).

4.14 Localização Intracelular de CIAIPc

Para este estudo, 1×10^6 células foram transferidas por poço, em placas de 24 poços com lamínulas redondas no fundo e incubadas em estufa a 37 °C por 24 h para aderir. Após esse período, o meio foi removido, e as amostras foram adicionadas nas concentrações a serem testadas. Após uma hora de incubação em estufa, as amostras foram retiradas, lavadas com PBS e, em seguida, 100 µL de paraformaldeído 4 % foi adicionado para fixar as células. Após a fixação, as lâminas foram montadas com *antifading Prolong Gold*, contendo DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol, dicloridrato) para marcação de DNA. As imagens foram capturadas no microscópio confocal LSM 700 Zeiss, UNIVAP (FINEP 01130275/00). Para o marcador DAPI, a excitação foi usada em 358 nm e a emissão capturada em 461 nm, para ftalocianina, o laser a 488 nm foi usado para excitação e emissão capturada acima de 500 nm.

4.15 Análise Estatística

Todos os testes foram realizados em triplicata, e todos os dados foram submetidos a ANOVA seguido pelo teste de Tukey. O Microsoft Excel foi utilizado para gerar os gráficos. Todos os dados são expressos como a média \pm desvio padrão de três experimentos independentes. Uma probabilidade valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo neste estudo

4.16 Análise de Custos

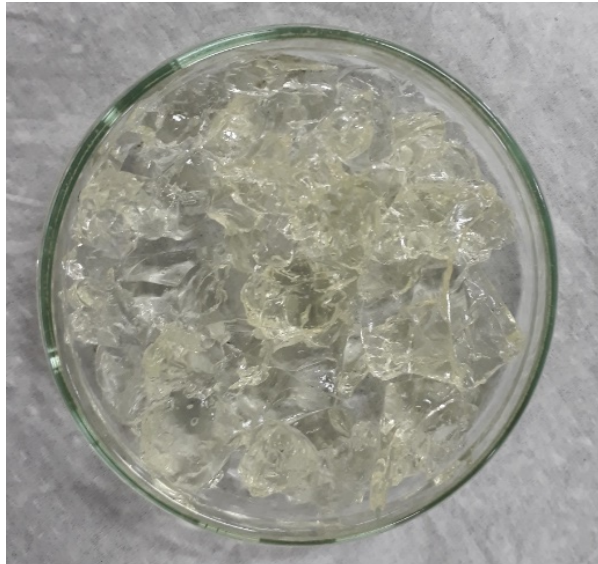
Uma das etapas do desenvolvimento de qualquer produto é o seu estudo de custos. Foram realizadas cotações dos valores para os principais componentes do sistema desenvolvido: gelatina, CIAIPc, DMSO, glutaraldeído, álcool etílico e água deionizada, todas retiradas da busca no site da Sigma – Aldrich.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Síntese do Hidrogel e do Xerogel

A síntese do hidrogel (Figura 7) teve base na metodologia descrita no item 4.2. O sistema polimérico foi formado usando apenas a gelatina como unidade monomérica, o que permite classificar o sistema como homopolimérico (KAROYO; WILSON, 2017). O início da síntese foi feito com a dissolução da gelatina a 40 °C, faixa de temperatura onde a solução corresponde ao estado “sol” e pode, em algumas situações evoluir para a formação de géis responsivos a temperatura. (BUKHARI et al, 2015; KAROYO; WILSON, 2017).

Figura 7 - Hidrogel após a síntese



Fonte: O Autor

A adição do glutaraldeído durante a síntese, confere ao sistema as características de ligações covalentes que o classificam como um sistema formado a partir do processo de *cross-linking químico*, conhecido por estabilidade em suas propriedades tanto físicas quanto químicas (FRACHINI; PETRI, 2019; GONSALVES et al., 2011). O processo de *cross-linking* também é responsável pelas estruturas tridimensionais características dos sistemas e tem influência direta em suas propriedades de intumescimento (BUKHARI et al, 2015; FRACHINI; PETRI, 2019; GONSALVES et al, 2011).

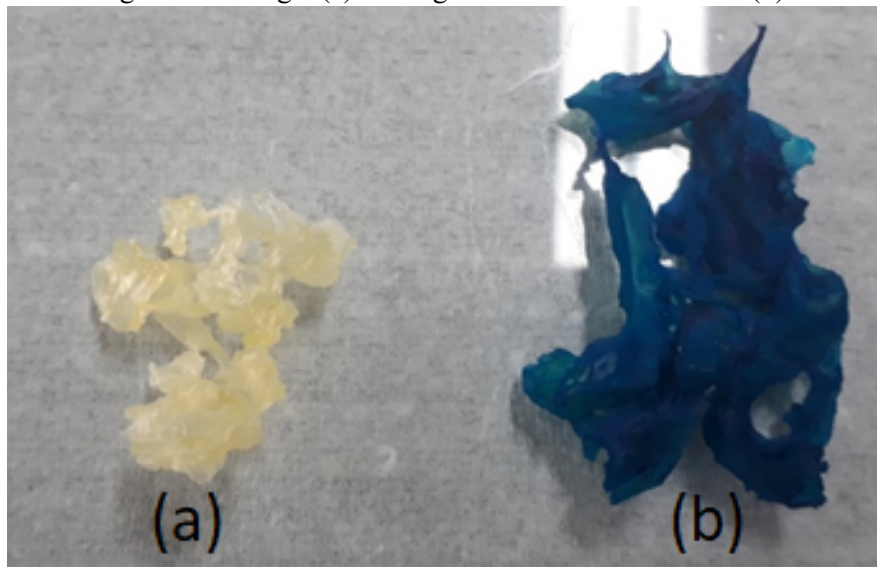
A literatura descreve a gelificação de muitos polímeros como resultado da transição das fases da solução, configuração de bobina, passando pela configuração de hélice, até a sua agregação, formando a configuração de rede tridimensional característica de tais sistemas

(KAROYO; WILSON, 2017). No caso da gelatina, redução na temperatura leva a transição entre a configuração de bobina para a configuração de hélice (WANG et al, 2017b). O polímero pode ser usado como agente gelificante, uma vez que possui cadeias laterais na molécula, permitindo a transição de “sol” para “gel” (BUKHARI et al, 2015; DANKS; HALL; SCHNEPP, 2016; KAROYO; WILSON, 2017; WANG et al, 2017a).

Após o final do processo de gelificação a amostra foi lavada e centrifugada para retirada de impurezas conforme a metodologia descrita por Bakravi et al (2018). Para a obtenção do xerogel (metodologia descrita no item 4.3) e realização dos processos de caracterização, o conteúdo da síntese foi congelado em nitrogênio líquido e passou pelo processo de secagem, que pode ser explicado em duas etapas: sendo a primeira delas o congelamento da amostra, etapa na qual ocorre o processo de sublimação, seguido pela secagem da mesma, onde ocorre a dessorção (BAKRAVI et al, 2018; MANOHAR; RAMESH, 2019), o método de secagem utilizado foi uma adaptação do processo de liofilização.

Na etapa seguinte, o fotossensibilizador ClAlPc foi adsorvido o sistema (Figura 8), segundo o qual o xerogel retém o FS dissolvido em sua cadeia de maneira uniforme (SAFAVI-MIRMAHALLEH; SALAMI-KALAJAHI; ROGHANI-MAMAQANI, 2020).

Figura 8 - Xerogel (a) e xerogel adsorvido com ClAlPc (b).



Fonte: O Autor

As etapas de caracterização que serão descritas nos próximos itens foram feitas utilizando amostras de hidrogel e xerogel, carregados e não carregados com a ClAlPc, a Tabela 1 relaciona cada ensaio de caracterização e a amostra utilizada.

Tabela 1 - Relação das amostras utilizadas em cada teste de caracterização

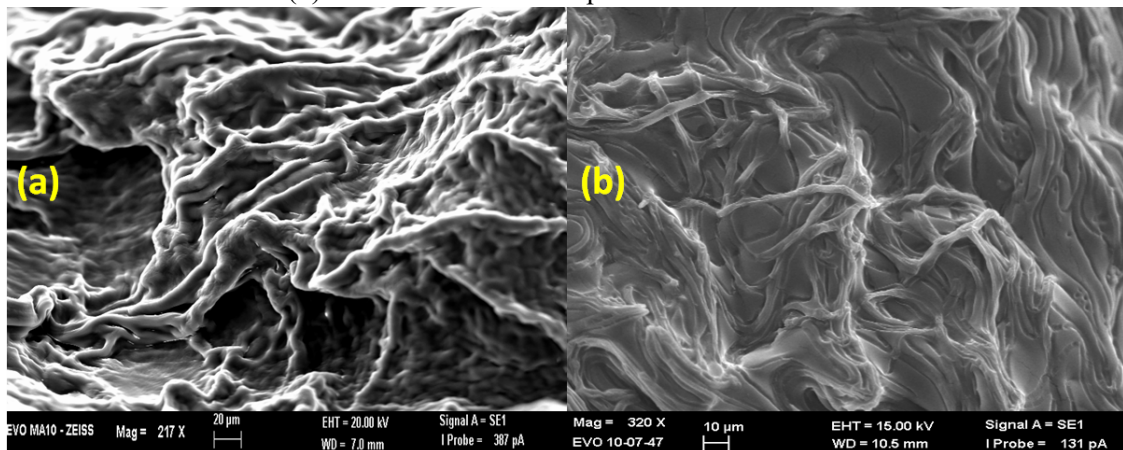
Caracterização	Amostra
MEV	Xerogel
% GI	Hidrogel e Xerogel
Espectroscopia no Uv-Vis	Xerogel - CIAIPc
% EC	Xerogel - CIAIPc
DSC e TGA	Xerogel
Espectroscopia no Infravermelho	Xerogel e Xerogel - CIAIPc
Viabilidade celular e localização intracelular	Xerogel e Xerogel - CIAIPc

Fonte: O Autor

5.2 Caracterização Morfológica

A análise da morfologia do sistema foi feita a partir da técnica de microscopia eletrônica de varredura, utilizando a técnica de elétrons secundários (Figura 9). A amostra para a leitura foi preparada da seguinte maneira: após a síntese, parte do xerogel foi cortado, recoberto com Au e analisado por MEV.

Figura 9 - Microscopia eletrônica de varredura do xerogel: (a) panorama da rede polimérica formada; (b) detalhamento da rede polimérica formada.



Fonte: O Autor

A partir da observação da imagem de MEV pode-se dizer que o sistema apresenta estrutura uniforme e a presença das redes em toda a sua composição, característica essencial para a determinação de um sistema hidrogel/ xerogel e descrita na literatura em Bakravi et al (2018), Unagolla e Jayasuriya (2020) e He et al (2021).

Segundo Zhou et al (2019), um processo de gelificação uniforme no sistema pode ser caracterizado pela presença de uma estrutura densa e de poros de escala micrométrica.

A estabilidade foi observada e considerada estável em condições neutras (pH = 7,4) após 5 dias. A amostra de xerogel também não apresentou agregações após armazenamento por 7 dias em temperatura ambiente. De acordo com Danks, Hall e Schnepf (2016), hidrogéis podem ser classificados como redes poliméricas agregadas fisicamente.

5.3 Avaliação do Grau de Intumescimento (% GI)

Foram realizados testes de avaliação do intumescimento (Tabela 2, Figura 10 - a,b) em dois grupos controle de amostras: Grupo A - composto por amostras do hidrogel e o Grupo B - composto por amostras do xerogel. Abaixo estão apresentados os valores referentes a média de cada bateria de experimentos (Tabela 1).

Tabela 2 - Média % GI

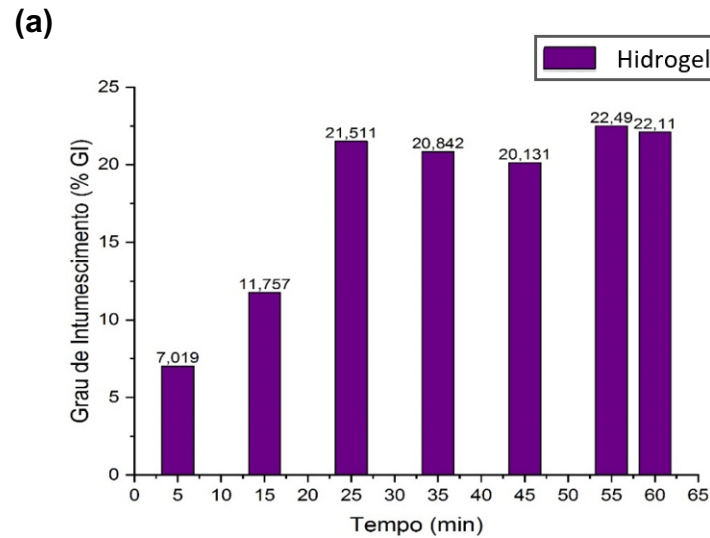
Tempo	% GI (Grupo A)	Desvio Padrão (Grupo A)	% GI (Grupo B)	Desvio Padrão (Grupo B)
05 min	7,02	3,27	277,83	58,08
15 min	11,75	7,44	328,09	66,08
25 min	21,51	10,17	351,11	21,18
35 min	20,84	5,82	276,22	75,35
45 min	20,13	6,99	497,83	61,83
55 min	22,49	1,22	527,23	33,58
60 min	22,11	5,01	638,45	320,64

Fonte: O Autor.

De acordo com Bukhari et al (2015) e El-Halah et al (2020) a propriedade de intumescimento está ligada a materiais que apresentam configuração de redes, resultado do processo de *cross-linking* entre as moléculas do polímero base do sistema, e pode ser descrita como a capacidade de um polímero não se dissolver enquanto absorve água ou determinado solvente. Após o contato inicial com a superfície do sistema, a água penetra nas redes do polímero por fenômenos como a capilaridade e difusão, formando ligações de hidrogênio por meio de sua absorção por hidroxilas, carboxilatos e aminos (BRITO et al, 2013; BUKHARI et al, 2015; EL-HALAH et al, 2020).

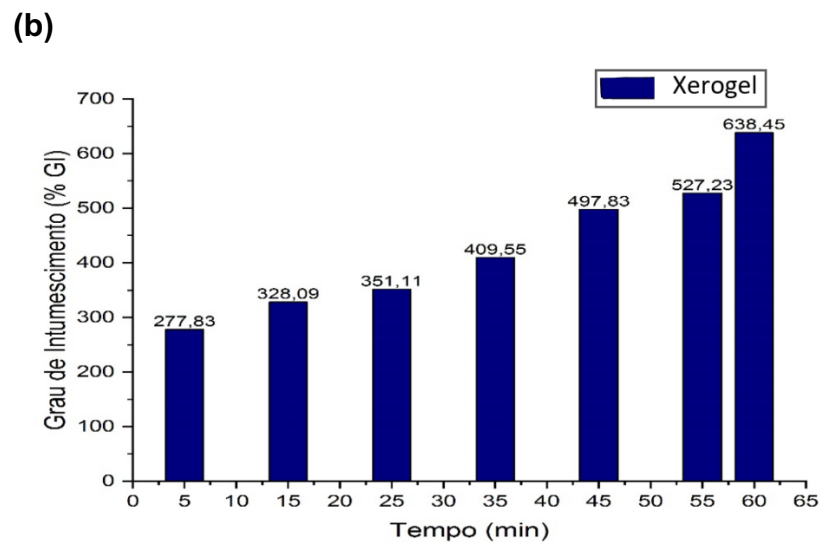
O processo de intumescimento de um hidrogel pode ser afetado por diversas variáveis como: pH, composição do sistema, influência do agente reticulante e temperatura (BRITO et al, 2013; OSTROWSKA-CZUBENKO; GIERSZEWSKA; PIERÓG, 2015).

Figura 10 - Grau de intumescimento: a) Grupo A



Fonte: O Autor

Figura 10: Grau de intumescimento: b) Grupo B



Fonte: O Autor

A partir da análise da Figura 10, que corresponde ao grau de intumescimento, é possível concluir que as amostras do Grupo B apresentam resultados superiores às do Grupo A. Em um comparativo apenas dos ensaios realizados com 60 min de imersão a amostra do

grupo A apresentou como resultado uma % GI correspondente a aproximadamente 1,56 % da capacidade da amostra do grupo B no mesmo período.

Esta grande diferença de potencial de intumescimento pode ser explicada com o fato de que o grupo B, embora apresente a mesma composição do Grupo A, passou pelo processo de secagem (semelhante ao processo de liofilização), que aumenta a área específica da amostra, expondo sua superfície, o que possibilita a melhora em seus índices de intumescimento, conforme observado na Figura 10: b) (CASSOL; FANTINEL; SILVA, 2020).

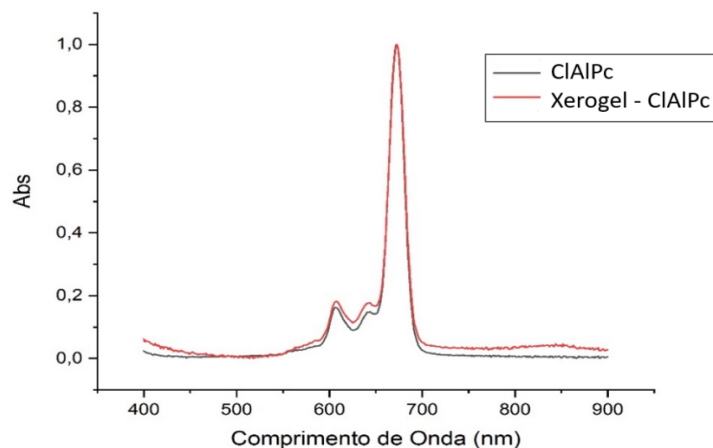
Utilizando em seus experimentos amostras de um sistema hidrogel Jiang et al (2018) descreve que nas primeiras 3 h do experimento os resultados referentes a % GI das amostras variaram em uma taxa lenta, de acordo com os índices mostrados na Figura 10: a). A partir dos 55 min de intumescimento da amostra observa-se uma diminuição da variação da % GI, um indicativo de que a amostra está se aproximando do ponto de equilíbrio, onde já não apresenta variações importantes na % GI (BORTOLIN et al, 2012)

A avaliação do grau de intumescimento de um sistema candidato ao uso como DDS é fundamental uma vez que essa característica pode influenciar na quantidade de FS que pode ser encapsulado e conseqüentemente entregue ao alvo do tratamento em questão (GANJI; VASHEGHANI-FARAHANI; VASHEGHANI-FARAHANI, 2010).

5.4 Análises Espectroscópicas no UV-Vis

A partir da espectroscopia no UV-Visível foi realizada a caracterização do sistema xerogel – CIAIPc e a sua comparação com uma amostra de CIAIPc dissolvida em DMSO 10 % ($0,5\mu\text{mol.L}^{-1}$) (Figura 11).

Figura 11 - Curva comparativa CIAIPc livre e incorporada no xerogel



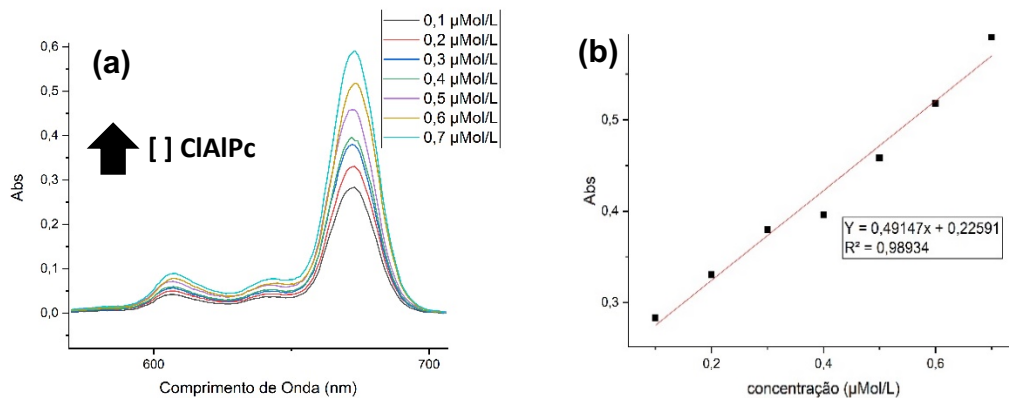
Fonte: O Autor.

A CIAIPc apresenta pico de absorvância máximo em 672 nm. Este valor se encontra dentro da faixa conhecida como janela terapêutica (650 – 800 nm), região onde a penetração da luz é maximizada, aumentando o potencial da CIAIPc para TFD. Pode – se observar a presença de bandas Q na região entre 600 e 700 nm. Tais leituras são referentes as transições de baixa energia entre os orbitais HOMO e LUMO. (BROGDON; CHEEMA; DELCAMP, 2018; HAMAM; ALOMARI, 2017).

Muitos dos FS, incluindo a CIAIPc tendem a formar agregados, conhecidos como dímeros, quando em solução aquosa ou em meio a solventes orgânicos. Nunes, Sguilla e Tedesco (2004) descreve dímeros como uma forma de FS inativa ou com poucas propriedades fotossensibilizantes. A formação de um dímero pode ser observada pela alteração no perfil espectral da CIAIPc, o que não foi observado no estudo, apontando que o FS manteve suas propriedades intrínsecas (FRADE et al.,2018; NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004).

Para a avaliação do comportamento da CIAIPc em diferentes concentrações foi realizada uma curva de calibração do FS (Figura 12). As diluições para a realização da leitura foram feitas com base em uma solução estoque de concentração 1×10^{-4} mol/L do fotossensibilizador, diluído em solução alcoólica de DMSO.

Figura 12 - a) Curva de calibração CIAIPc, b) Fit linear da concentração x Absorbância



Fonte: O Autor

Nunes, Sguilla e Tedesco (2004) descreve o comportamento das ftalocianinas como propenso a auto-agregação, o que pode levar a formação de dímeros (monômeros inativos do FS), que apresentam como uma das principais características alterações no espectro de absorção, o que não foi observado no estudo. A presença de um dímero além de significar alterações das propriedades espectroscópicas e fotodinâmicas de uma solução, acarreta também no aumento dos custos do tratamento, uma vez que será necessária maior

quantidade do FS para obtenção das características desejadas, pois em estado de agregação o fotossensibilizador perde seu potencial de atividade (LAN et al, 2019; MESQUITA et al, 2018; NUNES; SGUILLA; TEDESCO, 2004).

A linearidade de um método demonstra sua relação direta entre absorvância e concentração. Foi encontrado um valor satisfatório na faixa de concentração entre 0,1 e 0,7 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ ($R^2 = 0,98934$ – coeficiente de determinação $r = 0,9946$ - coeficiente de correlação), apresentando a seguinte correlação linear $Y = 0,49107 \times [\text{Concentração de CIAIPc } (\mu\text{mol.L}^{-1})] + 0,22591$.

5.5 Eficiência de Carregamento de CIAIPc no Sistema

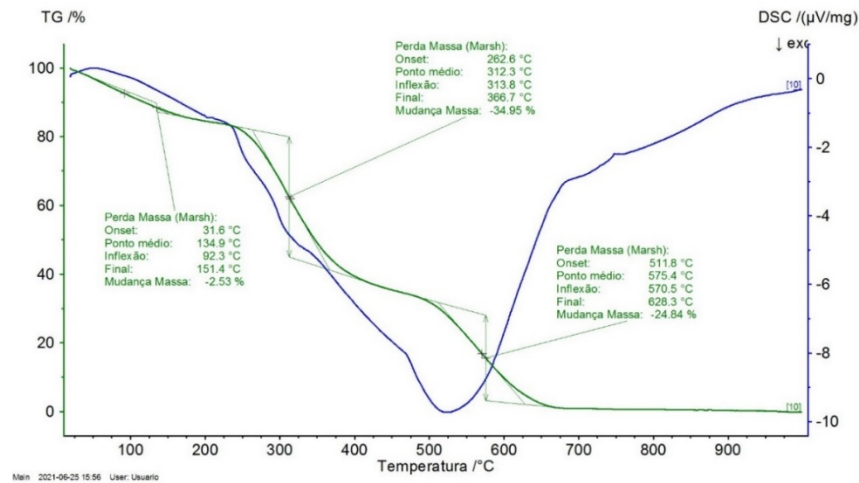
Para o cálculo da eficiência de carregamento de CIAIPc do sistema inicialmente foram pesados 366,2 mg do xerogel, que permaneceu em contato com uma solução 1mg.mL^{-1} de CIAIPc por 48 h e ao final do período a amostra foi seca com o auxílio de um papel absorvente e pesada novamente, obtendo-se o resultado de 480 mg.

Da amostra de xerogel - CIAIPc 35,2 mg foram utilizados para a realização dos estudos espectrométricos descritos no item acima, e a % EC foi calculada conforme a equação (2) do item 4.6. O valor encontrado para a % EC foi de 70 %, superior ao descrito por Bakravi et al (2018), que obteve % EC de 64 % utilizando cefalexina com FS em metodologia de síntese semelhante à realizada neste estudo.

5.6 Caracterização Térmica e Calorimétrica Do Xerogel

As análises térmicas (Figura 13) foram feitas a partir de uma amostra de xerogel.

Figura 13 - Termograma de DSC e TGA da amostra de xerogel



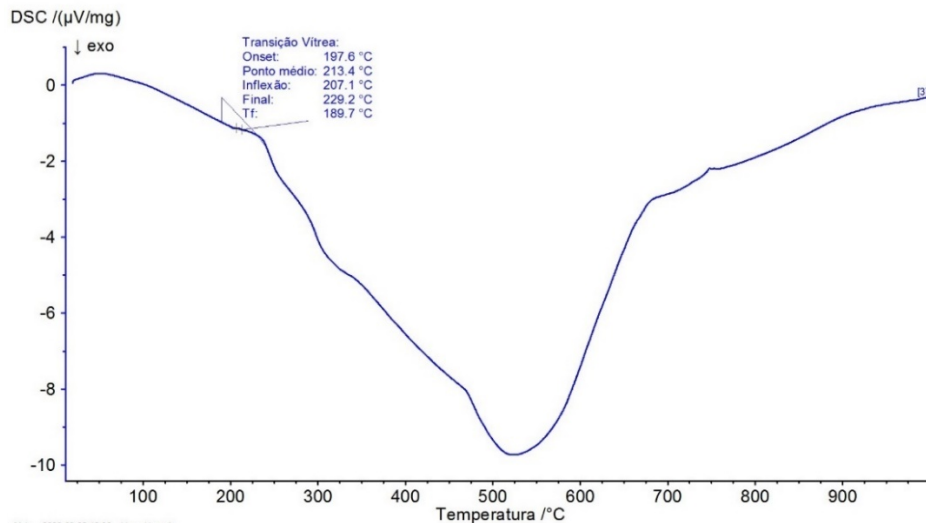
Fonte: O Autor

A análise da curva de TGA aponta o primeiro evento de perda de massa com variação de 3 % na massa do sistema entre 30 e 150 °C, que diz respeito a perda de água livre adsorvida no xerogel. Um segundo evento entre 260 °C e 360 °C apresentou variação de massa de aproximadamente 30 % e se relaciona a degradação das proteínas. O termograma registra ainda um terceiro evento de perda de massa entre 510 °C e 628 °C, correspondente a decomposição térmica do polímero (CORREIA et al, 2013; WANG et al, 2017a; ZHAO et al, 2020).

A curva correspondente ao DSC apresenta eventos exotérmicos, conforme o citado em Zhao et al (2020). Sistemas hidrogel que apresentam gelatina em sua composição podem apresentar melhores níveis de estabilidade térmica de acordo com seu grau de reticulação, presença de ligações covalentes e também de acordo com a configuração das hélices triplas presentes no sistema (CHEN et al, 2005; VARGHESE; CHELLAPPA; FATHIMA, 2014; QIAO et al, 2018).

A temperatura de transição vítrea (Figura 14) encontrada para a amostra localiza-se em torno de 197,6°C, uma vez que nas proximidades superior e inferior de temperatura a amostra não sofreu nenhum evento térmico, de acordo com a descrição de Subramanian e Vijayakumar (2013), sendo também a região onde inicia o declínio da curva correspondente ao DSC conforme o citado em Mendieta-Taboada, Carvalho e Sobral (2008).

Figura 14 - Temperatura de transição vítrea da amostra de xerogel



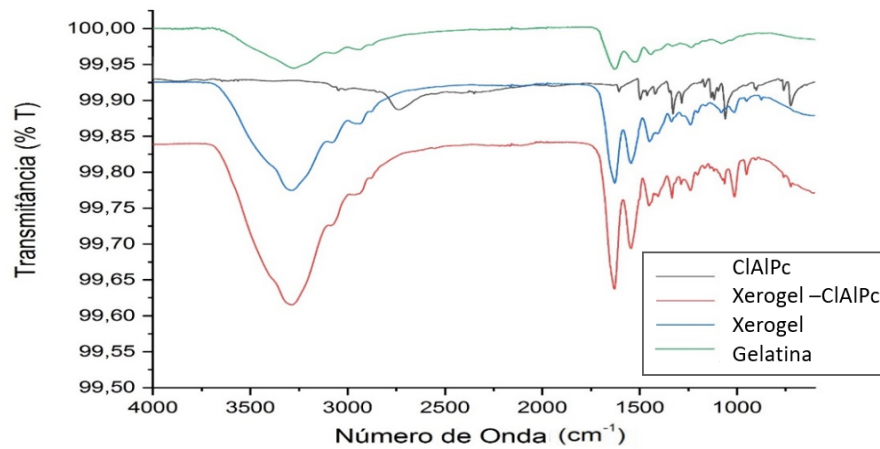
Fonte: O Autor.

Em estudos com uma formulação de hidrogel usando gelatina tipo B Xu et al (2020) encontrou um valor de transição vítrea de 104, 6 °C, diminuindo à medida que aumentava na formulação a quantidade do monômero ureido pirimidinona. A temperatura de transição vítrea de um material pode sofrer alterações de acordo com variações em seus processos de fabricação, como por exemplo o processo de reticulação, e variações da estrutura química do polímero (CATALAN et al, 2019; LÓPEZ-ÂNGULO et al, 2020; XU et al, 2020).

5.7 Análises Espectroscópicas no Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho (Figura 15) foi utilizada para a comparação das bandas correspondentes as ligações presentes nos materiais base do sistema de xerogel: CIAIPc e gelatina, com as frequências resultantes das leituras das amostras finais de xerogel e xerogel - CIAIPc.

Figura 15 - Espectro de FTIR das amostras de CIAIPc, gelatina, xerogel, xerogel - CIAIPc



Fonte: O autor

A comparação dos espectros do xerogel com os espectros presentes em Billiet et al (2013) e Saraiva et al (2015) permitem a observação das seguintes bandas correspondentes as bandas da gelatina: ligação N-H (estiramento na região dos 3300 cm^{-1}), ligação C=O (região dos 1630 cm^{-1}), ligação C-H (uma banda estiramento na região dos 1550 cm^{-1}), ligações N-H e C-N (correspondentes ao estiramento ao redor dos 1200 cm^{-1}), C-O (região dos 1000 cm^{-1}), ligação O-H (região 3400 cm^{-1}).

Já para a análise da amostra de xerogel - CIAIPc a comparação deve ser feita com a leitura das amostras de gelatina, descritas acima e com as amostras de CIAIPc. Os valores das bandas referentes as ligações do FS em Peres et al (2016) e em Souza, Zamora e Zawadzki (2010) são os seguintes: ligação C=C (banda na região dos 1200), ligação C=N (região de 1100), ligação N=Al (região dos 1300) e ligação Al-Cl (região dos 500).

O espectro FTIR do xerogel carregado com CIAIPc reflete as bandas de absorção características de CIAIPc e gelatina sem novas bandas óbvias, o que indica que a adsorção de CIAIPc na gelatina é física, e não química. Os outros componentes do sistema como H_2O , DMSO e glutaraldeído apresentam bandas de ligação nas mesmas regiões de leitura da amostra, não sendo apresentados no gráfico.

5.8 Teste de Exclusão e Viabilidade Celular por Azul de Tripán

O azul de tripan é um corante de baixo custo amplamente disponível usado para distinguir entre tecidos vivos intactos e células mortas permeáveis e detritos (LEBEAU et al,

2019). O hidrogel não foi tóxico para o sistema celular, demonstrando a biocompatibilidade do sistema desenvolvido. Os dados na Figura 16 mostraram que xerogel - CIAIPc não teve efeito sobre a viabilidade celular sem exposição à luz e que a incorporação da CIAIPc ao hidrogel não causou fototoxicidade. Em células HeLa, TFD mediada por 0,5 mg.mL⁻¹ hidrogel – CIAIPc mostrou uma diminuição na sobrevivência próxima a 95 %.

Figura 16 - Viabilidade celular (Teste de exclusão com azul de tripan)



Fonte: O Autor

Zhong et al (2021) estudou o uso de hidrogéis macroporosos injetáveis carregado com doxorrubicina (DOX), encontrando viabilidade celular das células 4T1 acima de 85 %, indicando que o hidrogel não apresentou toxicidade óbvia para células sem irradiação do laser. No entanto, a viabilidade celular diminuiu significativamente após o tratamento com laser. Esse resultado mostra uma alteração particularmente significativa em alta concentração, ou seja, em 0,2 mg.mL⁻¹, onde a viabilidade celular do grupo hidrogel sem auxílio do laser foi de 92,43 %, enquanto que para o grupo laser foi reduzido para 65,31 %, com diferença significativa ($p < 0,05$), sugerindo que o hidrogel tem um efeito fotodinâmico nas células (ZHONG et al, 2021).

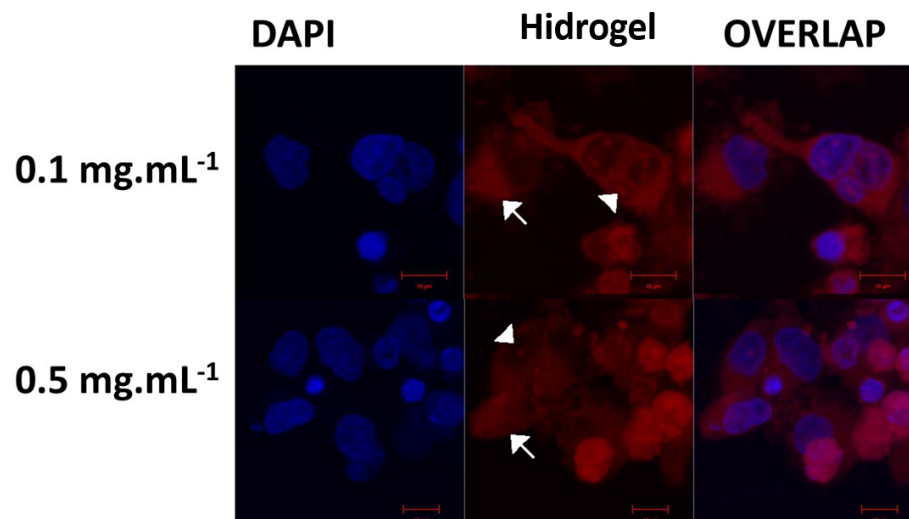
5.9 Localização Intracelular

O microscópio confocal utiliza um laser para excitar uma fina camada da amostra e coleta somente a luz emitida pela camada de interesse, produzindo uma imagem nítida e sem interferência das moléculas fluorescentes das camadas adjacentes (PAGANELLI et al, 2022).

A microscopia confocal foi realizada para sustentar a entrega do alvo e a absorção celular de hidrogel - CIAIPc.

Após 1 h de incubação, é possível observar o acúmulo do fotossensibilizador no citoplasma (seta) e dentro do núcleo (ponta de seta) em ambas as concentrações testadas (Figura 17).

Figura 17 - Imagens de microscopia confocal das células Hela CCL-2 após 1 h de incubação com hidrogel - CIAIPc. Fluorescência azul: DAPI (marcação nuclear); Fluorescência vermelha: Imagens de microscopia confocal das células Hela CCL-2 após 1 h de incubação com hidrogel - CIAIPc.



Fonte: O Autor

Pelo uso da microscopia confocal é possível observar a internalização da ftalocianina após 1h de incubação a 37 °C, com o acúmulo de FS no citoplasma (seta) e no interior do núcleo (ponta de seta) em ambas as concentrações testadas. Os resultados da microscopia confocal indicam fortemente que o xerogel – CIAIPc foi absorvido por pelas células Hela CCL-2. Przybylo et al (2016) mostraram que a protoporfirina IX encapsulada em lipossomas pode ser prontamente internalizado em células HeLa. Furlani et al (2022) estudou um sistema nanocompósito injetável baseado em um hidrogel termossensível de quitosana combinado com lipossomas para aplicações em medicina regenerativa por células HeLa, indicando que as

células incubadas com lipossomas incorporados em hidrogéis termossensíveis exibem uma maior absorção pelas células em comparação com células incubadas apenas com lipossomas (FURLANI et al, 2022; PRZYBYLO et al, 2016).

5.10 Análise De Custos

Uma das maneiras de aplicação do sistema sintetizado é a produção de curativos, de modo que o sistema já seja comercializado em porções prontas para a aplicação conjunta para o tratamento com a TFD, sendo então destinado a comercialização restrita ao ambiente hospitalar. A Tabela 3 contém a relação dos custos dos materiais base para o desenvolvimento do sistema em questão.

Tabela 3 - Relação de materiais utilizados na síntese e valores

Produto	Quantidade	Valor
Gelatina	100g	R\$ 421,00
Cloro Alumínio Ftalocianina	1g	R\$ 551,00
Glutaraldeído	10mL	R\$ 885,00
DMSO	1L	R\$ 801,00
Álcool etílico	1L	R\$ 719,00
Água deionizada	1L	R\$ 97,00

Fonte: Adaptado de Merck, 2022.

O valor total do investimento para a produção do sistema é de R\$ 3.474, 00 e tendo em vista que muitos dos materiais são comercializados em porções maiores que a utilizada, os mesmos podem ser reaproveitados em outras sínteses, diluindo o valor investido com relação a cada lote produzido.

6 CONCLUSÃO

Os sistemas a base de hidrogel tem recebido cada vez mais espaço e destaque no campo da biomedicina, da engenharia de tecidos e na nanotecnologia apresentando boas características mecânicas, de biocompatibilidade e de intumescimento, fatores que levam tais sistemas a serem candidatos a aplicação como sistema de liberação modificada de compostos bioativos.

O xerogel sintetizado via reticulação química se apresentou estável durante o período estudado. As imagens de MEV confirmaram a configuração em rede das cadeias do xerogel. Os estudos espectroscópicos não apresentaram alteração de perfil da CIAIPc quando carregada no xerogel, mantendo sua absorção máxima dentro da janela terapêutica. A eficiência de carregamento encontrada foi de 70 %. As análises do grau de intumescimento mostraram a eficiência do processo de secagem, aumentando a potencialidade do sistema no que diz respeito a absorção e retenção do FS. Os espectros do infravermelho para as amostras de xerogel - CIAIPc não apresentaram nenhuma nova banda, indicando que a adsorção do FS é física. As curvas de TGA e DSC demonstram os eventos de perda de massa e temperatura de transição vítrea correspondentes com o polímero formador do sistema. O estudo *in vitro* mostrou que a ativação induzida pela luz sobre o sistema hidrogel - CIAIPc ocasionou o efeito fotodinâmico nas células HeLa. A microscopia confocal de varredura a laser demonstrou acúmulo do hidrogel - CIAIPc no citoplasma e dentro do núcleo em ambas as concentrações testadas. Com base nos resultados obtidos, espera-se que o uso de xerogel – CIAIPc à base de gelatina seja promissor adjuvante no tratamento de neoplasias com base na aplicação de protocolos de TFD, contribuindo para o desenvolvimento científico e tecnológico da ciência com potencial grau de inovação e impacto na sociedade.

7 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

A partir dos resultados obtidos durante o período do mestrado (2020 – 2022) foram desenvolvidos e apresentados dois trabalhos: Hidrogel de gelatina encapsulado com cloro alumínio ftalocianina para aplicação em terapia fotodinâmica, apresentado II Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (II CDNB), organizado pela Embrapa e Síntese e caracterização de hidrogel de gelatina para uso como sistema de liberação controlada, apresentado no IV Workshop de Inovação em Engenharia Biomédica, organizado pelo curso de graduação e do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica do Instituto de Ciência e Tecnologia da UNIFESP. A partir de variações na concentração de gelatina utilizada e sua avaliação por MEV e quanto a % GI foi desenvolvido o artigo técnico: Estudo do efeito da concentração de gelatina na morfologia e no grau de intumescimento do hidrogel, submetido na revista Processos Químicos e com os dados desta dissertação foi produzido o artigo acadêmico: Synthesis and characterization of photosensitive gelatin-based hydrogels for photodynamic therapy in HeLa-CCL2 cell line, submetido a revista Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSE, H; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem. J.**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016.
- ALFAYA, A. A. S; KUBOTA, L. T. A utilização de materiais obtidos pelo processo de sol-gel na construção de biossensores. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 835-841, 2002.
- ASHKBAR, A. *et al.* Treatment of breast cancer in vivo by dual photodynamic and photothermal approaches with the aid of curcumin photosensitizer and magnetic nanoparticles. **Sci Rep.**, v. 10, n. 21206, p. 1-12, 2020.
- BAKRAVI, A. *et al.* Synthesis of gelatin-based biodegradable hydrogel nanocomposite and their application as drug delivery agent. **Adv Polym Technol.**, v.37, n.7, p. 2625–2635, 2018.
- BAYDA, S. *et al.* The History of Nanoscience and Nanotechnology: From Chemical–Physical Applications to Nanomedicine. **Molecules**, v.25, n.1:112, p. 1-15, 2020.
- BILLIET, T. *et al.* Quantitative contrasts in the photopolymerization of acrylamide and methacrylamide-functionalized gelatin hydrogel building blocks. **Macromol Biosci.**, v.13, n.11, p.1531-1545, 2013.
- BORTOLIN, A. *et al.* Investigação do processo de absorção de água de hidrogéis de polissacarídeo: efeito da carga iônica, presença de sais, concentrações de monômero e polissacarídeo. **Polímeros**, v. 22, n. 4, p. 311–317, 2012.
- BRITO, C. W. Q. *et al.* Síntese e caracterização de hidrogéis compósitos a partir de copolímeros acrilamidaacrilato e caulim: efeito da constituição de diferentes caulins do nordeste brasileiro. **Quim. Nova**, v. 36, n. 1, p. 40-45, 2013.
- BROGDON, P; CHEEMA, H; DELCAMP, J. H. Near-Infrared-Absorbing Metal-Free Organic, Porphyrin, and Phthalocyanine Sensitizers for Panchromatic Dye-Sensitized Solar Cells. **ChemSusChem**. v. 11, n.11, p. 86-103, 2018.
- BUKHARI, S. M. H. *et al.* Synthesis and Characterization of Chemically Cross-Linked Acrylic Acid/Gelatin Hydrogels: Effect of pH and Composition on Swelling and Drug Release. **International Journal of Polymer Science**, v. 2015, n. 187961, p.1-15,2015.
- CALIXTO, G. M. F. *et al.* Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 1-18, 2016.
- CARVALHO, J. A. *et al.* Preparation of gelatin nanoparticles by two step desolvation method for application in photodynamic therapy **J. Biomater. Sci. Polym. Ed.**, v. 29, n. 11, p.1287–1301, 2018.
- CARVALHO, R. A; GROSSO, C. R. F. Properties of chemically modified gelatin films. **Braz. J. Chem. Eng.**, v. 23, n. 01, p. 45 - 53, 2006.

- CASSOL, V. M; FANTINEL, L; SILVA, W. L. Estudo e viabilidade do revestimento de sementes da soja no processo da germinação a partir do uso de polímero hidrogel de amido de milho. **Disciplinarum Scientia. Série: Naturais e Tecnológicas.**, v. 21, n. 1, p. 103-115, 2020.
- CATALAN, K.N. *et al.* Glass Transition in Crosslinked Nanocomposite Scaffolds of Gelatin/Chitosan/Hydroxyapatite. **Polymers**, v.11, n.4, 2019.
- CHAI, Q; JIAO, Y; YU, X. Hydrogels for Biomedical Applications: Their Characteristics and the Mechanisms behind Them. **Gels.**, v. 3, n. 6, p.1-15, 2017.
- CHEN, P. *et al.* The evaluation of thermal properties and in vitro test of carbodiimide or glutaraldehyde cross-linked gelatin for pc 12 cells culture. **Biomed. Eng.**, v. 17, n. 2, p. 41-47, 2005.
- CIEPLIK, F. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy – what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology.** v. 44, n. 5, p. 571–589, 2018.
- CORREIA, D. M. *et al.* Thermal and hydrolytic degradation of electrospun fish gelatin membranes. **Polymer Testing.**, v. 32, n. 5, p. 995-1000, 2013.
- DANKS, A. E; HALL, S. R; SCHNEPP, Z. The evolution of ‘sol–gel’ chemistry as a technique for materials synthesis. **Mater. Horiz.**v.3, n.2, p. 91-112, 2016.
- DHARMARATNE, P. *et al.* Contemporary approaches and future perspectives of antibacterial photodynamic therapy (aPDT) against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): A systematic review. **European Journal of medicinal chemistry**, v. 200, n. 112341, p. 1-27, 2020.
- DIDONA, D. *et al.* Non Melanoma Skin Cancer Pathogenesis Overview. **Biomedicines.**, v.6, n.1, p. 1-15, 2018.
- DUAN, Y. *et al.* A brief review on solid lipid nanoparticles: part and parcel of contemporary drug delivery systems. **RSC Adv.**, v. 10, n. 1, p. 26777-26791, 2020.
- EL-HALAH, A. *et al.* Effect of the synthesis solvent in swelling ability of polyacrylamide hydrogels. **J Polym Res.**, v. 27, n. 21, p.1-10, 2020.
- FRACHINI, E. C. G.; PETRI, D. F. S. Magneto-Responsive Hydrogels: Preparation, Characterization, Biotechnological and Environmental Applications. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 30, n. 10, p. 2010-2028, 2019.
- FRADE, M. L. *et al.* Assessment of Chitosan-Based Hydrogel and Photodynamic Inactivation against *Propionibacterium acnes*. **Molecules**, v. 23, n. 473, p. 1-16, 2018.
- FURLANI, F. *et al.* Controlled liposome delivery from chitosan-based thermosensitive hydrogel for regenerative medicine, **Int J Mol Sci.**, v.23, n.2, p.894-905, 2022.

GANJI, F; VASHEGHANI-FARAHANI, S; VASHEGHANI-FARAHANI, E. Theoretical Description of Hydrogel Swelling: A Review. **Iranian Polymer Journal**, v.19, n.5, p.375-398, 2010.

GONSALVES, A. A. *et al.* Diferentes estratégias para a reticulação de quitosana. **Quim. Nova**, v. 34, n. 7, p.1215-1223, 2011.

GROULT, S; BUWALDA, S; BUDTOVA, T. Pectin hydrogels, aerogels, cryogels and xerogels: Influence of drying on structural and release properties. **European Polymer Journal**. v.149, n.110386, p.1-8, 2021.

GOTO, P. L; MOURA, M. P. S; TEDESCO, A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. **Int J Pharm.**, v. 518, n. 1-2, p. 228-241,2017.

HAMAM, K. J.; ALOMARI, M. I. A study of the optical band gap of zinc phthalocyanine nanoparticles using UV–Vis spectroscopy and DFT function. **Appl Nanosci.**, v. 7, n. 173, p. 261–268, 2017.

HE, T. *et al.* An Overview on Collagen and Gelatin-Based Cryogels: Fabrication, Classification, Properties and Biomedical Applications. **Polymers**, v. 13, n. 2299, p. 1-26, 2021.

HU, X. *et al.* Characterization of antioxidant and antibacterial gelatin films incorporated with Ginkgo biloba extract. **RSC Adv.**, v. 9, n. 47, p. 27449–27454, 2019.

JIANG, Y. *et al.* Dialdehyde cellulose nanocrystal/gelatin hydrogel optimized for 3D printing applications. **J Mater Sci.**, v. 53, n. 16, p. 11883–11900, 2018.

KAROYO, A. H.; WILSON, L. D. Physicochemical Properties and the Gelation Process of Supramolecular Hydrogels: A Review. **Gels.**, v. 3, n. 1, p. 1-18, 2017.

KAVOOSI, G. *et al.* Preparation and characterization of a novel gelatin–poly(vinyl alcohol) hydrogel film loaded with Zataria multiflora essential oil for antibacterial–antioxidant wound-dressing applications. **J. APPL. POLYM. SCI.**, v. 134, n. 39, p. 1-9, 2017.

LAN, M. *et al.* Photosensitizers for Photodynamic Therapy. **Adv Healthc Mater.** v.8, n.1900132, p 1-37, 2019.

LEBEAU, P. F. *et al.* The trypan blue cellular debris assay: a novel low-cost method for the rapid quantification of cell death, **MethodsX**. v.6, p. 1174-1180, 2019.

LI, X. *et al.* Gelatin films incorporated with thymol nanoemulsions: Physical properties and antimicrobial activities. **IJBMD.**, v.150, p. 161-168, 2020.

LI, Y; KUMACHEVA, E. Hydrogel microenvironments for cancer spheroid growth and drug screening. **Sci. Adv.**, v.4, n.4, p.1-10, 2018.

LIN, X. *et al.* Dual-Responsive Alginate Hydrogels for Controlled Release of Therapeutics. **Molecules.**, v. 24, n.11, p. 1-13, 2019.

LÓPEZ-ÂNGULO, D. *et al.* Effect of Laponite® on the structure, thermal stability and barrier properties of nanocomposite gelatin films. **Food Bioscience.**, v.35, n. 100596, 2020.

MANOHAR, P; RAMESH, N. Improved lyophilization conditions for long-term storage of bacteriophages. **Sci Rep.**, v. 9, n. 15242, p. 1-10, 2019.

MAZZILLI, M. R. F. *et al.* Polyelectrolytic BSA nanoparticles containing silicon dihydroxide phthalocyanine as a promising candidate for drug delivery systems for anticancer photodynamic therapy. **J Biomater Sci Polym Ed.**, v. 31, n. 11, p. 1457-1474, 2020.

MENDIETA-TABOADA, O; CARVALHO, R. A; SOBRAL, J. A. Análise dinâmico-mecânica: aplicações em filmes comestíveis. **Quim. Nova**, v. 31, n. 2, p. 384-393, 2008.

MERCK/ SIGMA ALDRICH. **Merck KGaA**. C2022. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com/BR/pt>. Acesso em: 25 fev. 2022

MESQUITA, M. Q. *et al.* An insight on the role of photosensitizer nanocarriers for Photodynamic Therapy. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, v. 90, n. 1, p. 1101-1130, 2018.

MOHANTY, M. N; SENAPATI, M. R. Application of Nanotechnology in Medical Science for Photodynamic Therapy. **IJECT.**, v. 8, n.4, p. 9-15, 2017.

MUEHLMANN, L. A. *et al.* Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and *in vitro* activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **J Nanobiotechnol.**, v. 13, n. 36, p.1-11, 2015.

NUNES, S. M. T; SGUILLA, F. S; TEDESCO, A. C. Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. **Braz J Med Biol Res.**, v. 37, n. 2, p. 273-284, 2004.

OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Rev. Virtual Quim.**, v.7, n.1, p. 310-335, 2015.

OSTROWSKA-CZUBENKO, J; GIERSZEWSKA, M; PIERÓG, M. pH-responsive hydrogel membranes based on modified chitosan: water transport and kinetics of swelling. **J Polym Res.** v.22, n.153, p. 1-12, 2015.

PAGANELLI, A. *et al.* Use of confocal microscopy imaging for in vitro assessment of adipose-derived mesenchymal stromal cells seeding on acellular dermal matrices: 3D reconstruction based on collagen autofluorescence. **Skin Res Technol.**, v.28, n.1, p.133-141, 2022.

PAKULSKA, M. M. *et al.* Encapsulation-free controlled release: Electrostatic adsorption eliminates the need for protein encapsulation in PLGA nanoparticles. **Sci. Adv.** v.2, n.5, p. 1-10, 2016.

- PERES, M. F. S. *et al.* Bacterial Cellulose Membranes as a Potential Drug Delivery System for Photodynamic Therapy of Skin Cancer. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 27, n. 11, p. 1949-1959, 2016.
- PRZYBYLO, M. *et al.* The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells, **Eur J Pharm Sci.**, v.85, p.39-46, 2016.
- QIAO, C. *et al.* Effect of salt on the coil-helix transition of gelatin at early stages: Optical rotation, rheology and DSC studies. **Int. J. Biol. Macromol.**, v.107, p. 1074-1079, 2018.
- RIVAS, M. *et al.* Peptide Self-Assembly into Hydrogels for Biomedical Applications Related to Hydroxyapatite. **Gels.**, v. 5, n. 14, p. 1-29, 2019.
- RUNGSIMA, C. *et al.* Hydrogel sensors with pH sensitivity. **Polym. Bull.**, n. 78, p. 5769-5787, 2020.
- SAFAVI-MIRMAHALLEH, S. A; SALAMI-KALAJAHI, M; ROGHANI-MAMAQANI, H. Adsorption kinetics of methyl orange from water by pH-sensitive poly(2-(dimethylamino)ethyl methacrylate)/nanocrystalline cellulose hydrogels. **Environ Sci Pollut Res.**, v.27, p.28091–28103, 2020.
- SANTOS, A. F. *et al.* Photodynamic therapy in cancer treatment – an update review. **J Cancer Metastasis Treat**, v.5, n.25, p.1-20, 2019.
- SARAIVA, S. M. *et al.* Synthesis and characterization of a photocrosslinkable chitosan–gelatin hydrogel aimed for tissue regeneration. **RSC Adv.**, v. 5, n. 78, p. 63478–63488, 2015.
- SAWADA, N. O. *et al.* Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Rev Esc Enferm USP.**, v. 43, n. 3, p.581-587, 2009.
- SCICLUNA, M. C; VELLA-ZARB, L. Evolution of Nanocarrier Drug-Delivery Systems and Recent Advancements in Covalent Organic Framework–Drug Systems. **CS Appl. Nano Mater.**, v. 3, n.4, p.3097–3115, 2020.
- SHANMUGAPRIYA, K. *et al.* Nanoengineered chlorin e6 conjugated with hydrogel for photodynamic therapy on cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.** v.181, p.778–788, 2019.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P. *et al.* Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.
- SOUZA, K. V; ZAMORA, P. G. P; ZAWADZKI, S. F. Esferas de Quitosana/Fe na Degradação do Corante Azul QR-19 por Processos Foto-Fenton Utilizando Luz Artificial ou Solar. **Polímeros**, v. 20, n.3, p. 210-214, 2010.
- SUBRAMANIAN, K; VIJAYAKUMAR, V. Evaluation of isophorone diisocyanate crosslinkedgelatin as a carrier for controlled delivery of drugs. **Polym. Bull.**, v.70, p.733–753, 2013.

- UNAGOLLA, J. M; JAYASURIYA, A. C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. **Applied Materials Today**, v.18, n.100479, p. 1-22, 2020.
- VARGHESE, J. S; CHELLAPPA, N; FATHIMA, N. N. Gelatin–carrageenan hydrogels: Role of pore size distribution on drug delivery process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces.**, v. 113, p. 346-351, 2014.
- WANG, J. *et al.* Hydrogel 3D printing with the capacitor edge effect. **Sci. Adv.**, v. 5, n. 3, 2019.
- WANG, K. *et al.* Mechanical and barrier properties of maize starch–gelatin composite films: effects of amylose content. **J Sci Food Agric.** v.97, n.11, p.3613-3622, 2017a.
- WANG, Y. *et al.* Agar/gelatin bilayer gel matrix fabricated by simple thermo-responsive sol-gel transition method. **Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.** v.77, p.293-299, 2017b.
- WILSON, B. C. Photodynamic therapy for cancer: Principles. **Can J Gastroenterol.**, v. 16, n. 6, p. 393-396, 2002.
- XU, Y. *et al.* Self-healing gelatin-based shape memory hydrogels via quadruple hydrogen bonding and coordination crosslinking for controlled delivery of 5-fluorouracil. **J. Biomater. Sci. Pol. Ed.**, v. 31, n. 6, p. 712–728, 2020.
- YARAKI, M. T. *et al.* Nanosilver-enhanced AIE photosensitizer for simultaneous bioimaging and photodynamic therapy. **Mater. Chem. Front.**, v. 10, n. 4, p. 3074-3085, 2020.
- ZHANG, S. *et al.* An inflammation-targeting hydrogel for local drug delivery in inflammatory bowel disease. **Sci Transl Med.**, v. 7, n. 300, p. 1-11, 2015.
- ZHAO, L. *et al.* Electrospun Gelatin Nanocontainers for Enhanced Biopharmaceutical Performance of Piroxicam: In Vivo and In Vitro Investigations. **Int J nanomedicine.**, v. 15, p. 8819–8828, 2020.
- ZHOU, X. *et al.* Architecting highly hydratable polymer networks to tune the water state for solar water purification. **Sci. Adv.**, v. 5, n. 6, p. 1-7, 2019.
- ZHONG, Y. *et al.* Sequential drug delivery by injectable macroporous hydrogels for combined photodynamic-chemotherapy, **J Nanobiotechnol.** v.19, n.333, p.333-346, 2021.