

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

MARIA CRISTINA MODESTO CLEMENTINO DE TOLEDO

**NANOPARTÍCULAS POLIELETROLÍTICAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO  
GLICÓLICO) CONTENDO UM DERIVADO DE FTALOCIANINA PARA APLICAÇÃO  
EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

São José dos Campos, SP  
2020

MARIA CRISTINA MODESTO CLEMENTINO DE TOLEDO

**NANOPARTÍCULAS POLIELETROLÍTICAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO  
GLICÓLICO) CONTENDO UM DERIVADO DE FTALOCIANINA PARA APLICAÇÃO  
EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioengenharia, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Mestre em Bioengenharia.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Andreza Ribeiro Simioni

São José dos Campos, SP  
2020

**TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA**

**Ficha catalográfica**

de Toledo, Maria Cristina Modesto Clementino  
Nanopartículas polieletrólíticas de poli(ácido  
lático-co-ácido glicólico) contendo um derivado de ftalocianina  
para aplicação em terapia fotodinâmica / Maria Cristina Modesto  
Clementino de Toledo; orientador, Andreza Ribeiro Simioni. - São  
José dos Campos, SP, 2020.  
53 p.

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

Inclui referências

1. Bioengenharia. 2. Nanopartículas. 3. PLGA. 4. Terapia  
fotodinâmica. 5. Polieletrólitos. I. Simioni, Andreza Ribeiro,  
orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de  
Pós-Graduação em Bioengenharia. III. Título.

Eu, Maria Cristina Modesto Clementino de Toledo, 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, 2 de Julho de 2020.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 08 / 07 / 2020

---

**MARIA CRISTINA MODESTO CLEMENTINO DE TOLEDO**

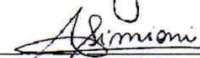
**“NANOPARTÍCULAS POLIELETROLÍTICAS DE POLI(ÁCIDO LÁTICO-CO-ÁCIDO GLICÓLICO) CONTENDO UM DERIVADO DE FTALOCIANINA PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA.”**

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

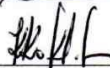
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> ERIKA PETERSON GONÇALVES



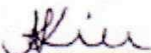
PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> ANDREZA RIBEIRO SIMIONI



PROF.<sup>ª</sup> DR.<sup>ª</sup> KUMIKO KOIBUCHI SAKANE



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



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

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 08 de julho de 2020.

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais, Antonio e Maria, por sempre acreditarem em mim e por terem sempre incentivado a mim e meus irmãos (Corina e Antonio) na busca do conhecimento.

Ao meu marido William Diniz, meu alicerce, companheiro de jornada, de vida e de sonhos, que sempre me apoiou e incentivou em tudo. Nada disso teria sentido se você não existisse em minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida e por me permitir realizar tantos sonhos ao longo destes anos. Por não ter me permitido desistir nas tempestades e mares agitados. Obrigada Deus por me permitir aprender, errar, crescer e a ter discernimento nos momentos de decisões. Obrigada por tudo!

A Prof.<sup>a</sup> Dra. Andreza Ribeiro Simioni, pela orientação, profissionalismo, pelos ensinamentos no laboratório, pelo auxílio no desenvolvimento desta dissertação e ajuda em variações medições.

Aos membros da banca examinadora, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Erika Peterson Gonçalves, Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Andrea Santos Liu e Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Kumiko Koibuchi Sakane, que tão gentilmente aceitaram participar e colaborar com esta dissertação.

A Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sonia Khouri, que desde a graduação me incentivou a realizar iniciação científica, me apoiando em meus projetos, além de ter sido orientadora de meu TCC e banca de minha qualificação de mestrado. Serei eternamente grata por todos os ensinamentos, pela dedicação, competência, apoio e todo conhecimento compartilhado que pode me passar durante toda esta minha trajetória e pelo um ser humano incrível que me ajudou com os melhores conselhos em minha vida. Obrigada!

Á todos meus colegas Biomédicos que compartilharam conhecimento em inúmeras conversas durante a jornada de trabalho e a cada mensagem de perseverança que me deram durante minha construção profissional e pessoal. Saibam que são um espelho para mim desde o período da minha decisão em ser biomédica, nos locais de estágios que realizei, até nos laboratórios que atuo hoje como profissional. Sempre procurarei ser um espelho para todos os futuros profissionais da saúde. Se hoje cheguei até aqui, foi por ter escutado algo de todos: “Você é forte, guerreira e única. Você é capaz de mover mundos e nunca perca a humildade, simplicidade e esperança no mundo melhor!”. Honrarei estas palavras sempre!

Aos amigos que a vida me deu antes e durante esta jornada e que nunca estiveram ausentes. Obrigada por serem meu ânimo diário a cada plantão diurno e noturno que estávamos juntos, por terem sido um ombro amigo em todas as minhas correrias diárias, pelas risadas, pelos meus momentos de sonolência, pelos meus momentos chorosos, por cada recadinho em um dia qualquer. Estarão sempre em minhas orações

À minha família, tios(as), primos(as), cunhados(as) e aos meus sogros Alonso e Solange, por apoiarem e compreenderem o meu isolamento e ausência durante este período intenso.

Aos meus pais, Maria e Antonio, deixo um agradecimento mais que especial, por todas as lições de amor, companheirismo, amizade, caridade, dedicação e ânimo que vocês me dão a cada novo dia. Sinto-me orgulhoso e privilegiado por ter pais tão especiais. E aos meus irmãos Corina e Antonio, sempre prontos a me apoiarem em tudo nesta vida.

Ao meu amado esposo William, por todo amor, carinho, compreensão e apoio em tantos momentos difíceis desta caminhada. Ao meu exemplo diário de ser humano. Obrigado por permanecer ao meu lado em todos os momentos alegres e difíceis que passei ao longo deste período. Ambos estudando em prol da ciência e da tecnologia, um apoiando o outro, sorrindo pelas conquistas, sendo porto seguro nos momentos de aflição e alicerce nos momentos de oração. Esta caminhada seria impossível se não tivesse seu apoio e amor. Juntos sempre e até o céu. Ad Aeternum!

## **EPIGRAFE**

“Não é sobre ganhar, é sobre não desistir. Se você tem um sonho, lute por ele. Existe uma disciplina. Não é sobre quantas vezes você foi rejeitado, caiu e teve que levantar. É quantas vezes você fica em pé, levanta a cabeça e segue em frente.”

(Lady Gaga – Cantora norte-americana)

## RESUMO

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade alternativa para tratamento de tecidos neoplásicos, que se baseia na administração de um fármaco fotossensível e irradiação de luz em um comprimento de onda adequado, visando localizar e destruir a célula alvo do tratamento, a partir da formação de espécies reativas de oxigênio. A tecnologia de nanoencapsulação se apresenta como uma ferramenta para incorporação de substâncias bioativas, visando melhorar a sua solubilidade em ambiente fisiológico, obter um maior tempo de circulação no organismo, administração de menores dosagens e a minimização de efeitos colaterais. O presente trabalho visou o desenvolvimento de nanopartículas de poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) revestidas com camadas de filmes de polieletrólitos para o encapsulamento da zinco ftalocianina tetrassulfonada ( $ZnPcSO_4$ ), como modelo de substância bioativa. As nanopartículas de PLGA foram produzidas pela técnica de dupla emulsão/evaporação do solvente e o recobrimento polieletrólítico foi realizado utilizando o hidrocloreto de poli-alilamina (PAH) como um polycation fraco e o poli-(4-estireno sulfonato de sódio) (PSS) como um poliânion forte pela técnica de automontagem camada por camada (conhecida como *layer-by-layer-LbL*). As nanopartículas de PLGA revestidas por polieletrólitos apresentaram diâmetro médio de  $384,7 \pm 138,6$  nm, tamanho de distribuição restrito com um índice de polidispersidade de 0,180. A mudança óbvia do potencial zeta indica alternância bem-sucedida na deposição do polycation (PAH) e do poliânion (PSS) diretamente nas nanopartículas de PLGA. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) mostrou que o sistema formado apresenta morfologia esférica, típica destes sistemas de liberação. A eficiência de carregamento foi de  $82,1\% \pm 1,2\%$ . As nanopartículas polieletrólíticas carregadas com a ftalocianina mantiveram seu comportamento fotofísico após o encapsulamento. A viabilidade celular foi determinada, obtendo-se 90% de morte celular. Todas as caracterizações físico-químicas, fotofísicas e fotobiológicas indicaram que as nanopartículas polieletrólíticas carregadas com a ftalocianina são um sistema promissor de administração de medicamentos para terapia fotodinâmica e fotoprocessos.

Palavras-chave: Emulsão/Evaporação do Solvente. Ftalocianina. Nanopartículas. PLGA.

Polieletrólitos. Terapia Fotodinâmica.

# **POLYELECTROLYTIC NANOPARTICLES OF POLI (LACTIC ACID-CO-GLYCOLIC ACID) CONTAINING A PHALOCYANINE DERIVATIVE FOR APPLICATION IN PHOTODYNAMIC THERAPY**

## **ABSTRACT**

Photodynamic Therapy (PDT) is an alternative modality for the treatment of neoplastic tissues, which is based on the administration of a photosensitive drug and light irradiation at an appropriate wavelength, aiming to locate and destroy the target cell from the formation of reactive oxygen species. Nanoencapsulation technology presents itself as a tool for incorporation of bioactive substances aiming to improve their solubility in physiological environment, obtain a longer circulation time in the organism, administration of lower dosages and the minimization of side effects. The present work aimed at the development of poly (lactic acid-glycolic acid) (PLGA) nanoparticles coated with polyelectrolyte film layers for encapsulating tetrasulfonated zinc phthalocyanine ( $ZnPcSO_4$ ) as a bioactive substance model. PLGA nanoparticles were produced by the double emulsion / solvent evaporation technique and polyelectrolytic coating was performed using polyalkylamine hydrochloride (PAH) as a weak polycation and poly (4-styrene sulfonate) (PSS) as a strong polyanion by *layer-by-layer* self-assembly technique (known as *layer-by-layer-LbL*). The polyelectrolyte-coated PLGA nanoparticles had an average diameter of  $384.7 \pm 138.6$  nm, restricted distribution size with a polydispersity index. The obvious change in zeta potential indicates successful alternation in polycation (PAH) and polyanion (PSS) deposition directly in PLGA nanoparticles. Scanning electron microscopy (SEM) analysis showed that the formed system had morphology spherical, typical of these release systems. The loading efficiency was  $82.1\% \pm 1.2\%$ . The polyelectrolytic nanoparticles loaded with phthalocyanine maintained their photophysical behavior after encapsulation. Cell viability was determined, obtaining 90% cell death. All characterizations physicochemical, photophysical and photobiological studies indicated that polyelectrolytic nanoparticles loaded with phthalocyanine are a promising drug delivery system for photodynamic therapy and photoprocesses.

Keywords: Emulsion/Solvent Evaporation. Phthalocyanine. Nanoparticles. PLGA.

Polyelectrolytes. Photodynamic Therapy

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Perfis da concentração plasmática de fármaco em função do tempo. ....	20
Figura 2 - Estrutura morfológica das nanopartículas poliméricas: nanoesfera e nanocápsula. ....	20
Figura 3 - Estrutura química do poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA). ....	21
Figura 4 - Diagrama de Jablonski adaptado para descrever as possíveis trajetórias após a excitação da molécula de FS. ....	24
Figura 5 - Representação da estrutura química da Zinco Ftalocianina Tetrassulfonada (ZnPcSO <sub>4</sub> ). .....	25
Figura 6 - Fluxograma da metodologia de dupla emulsificação/evaporação do solvente utilizado no preparo da nanopartículas de PLGA. ....	29
Figura 7 - Esquema de preparação das nanopartículas de PLGA polieletrólíticas (NP-PLGA/ZnPcSO <sub>4</sub> ). ....	30
Figura 8 – Micrografia: a) das nanopartículas de PLGA; b) das nanopartículas de PLGA polieletrólíticas fotossensíveis. ....	35
Figura 9 - Potencial zeta para nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) revestidas com PAH e PSS (n = 3; média ± desvio padrão). ....	36
Figura 10 - Distribuição do tamanho por medidas de PCS para as nanopartículas de: (a) PLGA não revestidas e (b) PLGA/ZnPcSO <sub>4</sub> revestidas. ....	37
Figura 11 - Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de PLGA/ZnPcSO <sub>4</sub> revestidas com polieletrólitos monitorada durante 90 dias após a preparação. ....	38
Figura 12 - Espectros de absorção da ZnPcSO <sub>4</sub> (1 µmol.L <sup>-1</sup> ) em etanol/DMSO: (-) ZnPcSO <sub>4</sub> livre; (-) ZnPcSO <sub>4</sub> extraído de nanopartículas polieletrólítica de PLGA; (-) nanopartícula de PLGA sem o fármaco. ....	39
Figura 13 - (a) Espectros de absorção de ZnPcSO <sub>4</sub> em diferentes concentrações (1,0 – 10 µmol.L <sup>-1</sup> ). (b): gráfico da concentração de ZnPcSO <sub>4</sub> vs. absorbância. ....	40
Figura 14 - Perfil de liberação de ZnPcSO <sub>4</sub> encapsulada em nanopartículas poliméricas de PLGA recobertas por uma camada do complexo {PAH/PSS}. ....	41
Figura 15 - Citotoxicidade do fotossensibilizador ZnPcSO <sub>4</sub> em linhagem celular B-16. ....	43
Figura 16 - Fototoxicidade do fotossensibilizador ZnPcSO <sub>4</sub> em linhagem celular B-16. ....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DCM	Diclorometano
DDS	Drug delivery systems
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
ERO's	Espécies reativas de oxigênio singlete
FS	Fotossensibilizador
HPMA	Copolímeros de N-(2-hidroxipropil)-metacrilato
LbL	<i>Layer by Layer</i>
MTT	Método de proliferação celular
PAA	Poli (ácido acrílico)
PAH	Poli (alilamina hidrocloreada) (PAH)
PBS	Fosfato de sódio
Pc	Ftalocianina
PCL	Poli (caprolactona)
PDI	Índice de Polidispersidade
PEM	<i>Polyelectrolyte multilayer</i>
PGA	Poli (ácido glutâmico)
PLA	Poli (ácido láctico)
PLGA	Poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico)
PLL	Polililina
PSS	Poli (estireno sulfonato de sódio)
PVA	Álcool polivinílico
TFD	Terapia fotodinâmica
UV-Vis	Espectroscopia no ultravioleta visível
ZnPcSO <sub>4</sub>	Zinco ftalocianina tetrassulfonada

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	OBJETIVO GERAL .....	17
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	17
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1	NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA .....	18
2.2	SISTEMAS CARREGADORES DE FÁRMACOS.....	19
2.3	NANOPARTÍCULA DE PLGA.....	20
2.4	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	22
2.5	CORANTES.....	24
2.6	<i>LAYER BY LAYER</i> .....	26
<b>3</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
3.1	MATERIAIS .....	28
3.2	FABRICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA POLIELETROLÍTICAS .....	28
3.3	CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA.....	30
3.4	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE NP-PLGA/ ZNPCSO <sub>4</sub> .....	30
3.5	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO UV-VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	31
3.6	RENDIMENTO DO PROCESSO (%) .....	31
3.7	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO (EE).....	31
3.8	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO <i>IN VITRO</i> .....	32
3.9	CULTURAS DE CÉLULAS .....	32
3.10	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS NP-PLGA/ ZNPCSO <sub>4</sub> .....	33
3.11	ENSAIO DE FOTOCITOTOXICIDADE DAS NP-PLGA/ZnPcSO <sub>4</sub> EM CÉLULAS DE MELANOMA DE CAMUNDONGO .....	33
3.12	ENSAIO DE VIABILIDADE POR MTT .....	34
3.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	34
<b>4</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>35</b>
4.1	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NANOPARTICULADO .....	35
4.2	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL.....	39

4.3	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO <i>IN VITRO</i> .....	40
4.4	ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> .....	42
5	CONCLUSÃO .....	45
	REFERÊNCIAS .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

Nas áreas médicas e farmacêuticas, os vastos estudos sobre a eficácia de nanofármacos têm sido estudados a fim de aprimorar técnicas de terapia e diagnóstico, resultando na formulação de diferentes nanopartículas. A nanotecnologia teve uma rápida expansão com a síntese de nanopartículas com composições químicas diferentes, exigindo cada vez mais estudos inovadores e aprofundados, uma vez que trata-se de uma tecnologia que envolve o conhecimento de forma transdisciplinar e multidisciplinar (DING *et al.*, 2018; KOLLURU *et al.*, 2013; SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Ao desenvolver sistemas de liberação de fármacos, se faz necessário um sistema de encapsulamento e liberação diferente dos comumente empregados nos fármacos sintéticos, sobretudo em relação da hidrofília destas moléculas, do tamanho e das mudanças conformacionais que estas moléculas podem sofrer, podendo resultar na perda de sua atividade (LI, S. *et al.*, 2012). Atualmente, as nanopartículas poliméricas biodegradáveis estão sendo cada vez mais utilizadas para aumentar a eficácia terapêutica de fármacos, desenvolvendo e aprimorando sua solubilidade, tempo de retenção e sua biodisponibilidade desde o diagnóstico e até o tratamento de doenças como o câncer (CALZONI *et al.*, 2019).

Os polímeros mais utilizados na preparação de nanopartículas na área farmacêutica são poli (ácido D, L-láctico-co-glicólico) (PLGA), poli (ácido láctico) (PLA), poli (ácido glutâmico) (PGA), poli (caprolactona) (PCL), copolímeros de N-(2-hidroxipropil)-metacrilato (HPMA), polissacarídeos e poli (aminoácidos) (DOS SANTOS *et al.*, 2017). Nanopartículas de PLGA são fáceis de produzir e exibem excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade.

O direcionamento ativo destas nanopartículas é promissor para o tratamento do câncer, o qual se baseia na utilização destas nanoestruturas funcionalizadas nos fármacos. Estes sistemas nanoparticulados têm a propriedade de se acumular preferencialmente em tecidos cancerígenos, oferecendo uma melhor farmacocinética, limitando sua concentração no tecido normal (MOHANTY *et al.*, 2011).

A terapia fotodinâmica (TFD) tem se tornando uma técnica promissora no tratamento de vários tipos de câncer proporcionando uma baixa toxicidade sistêmica e podendo ser aplicada localmente sobre uma região específica para o tratamento do tumor minimizando os efeitos colaterais quando

comparada a técnicas tradicionais como quimioterapia e radioterapia (DA HORA MACHADO, 2000).

Na TFD, um composto fotossensível, chamado de fotossensibilizador (FS), é ativado por luz em um comprimento de onda específico, e na presença de oxigênio molecular, produz uma cascata de reações, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete, induzindo a morte celular, seja por apoptose ou necrose (PERUSSI, 2007).

A zinco ftalocianina tetrassulfonada ( $ZnPcSO_4$ ), é um composto promissor pertencente a 2ª geração de fotossensibilizadores e se destaca por apresentar um pico de absorção na região do vermelho no espectro eletromagnético (na região de 670 nm) e conseqüentemente uma maior penetração tecidual (SALIS *et al.*, 2015).

A  $ZnPcSO_4$  apresenta características adequadas para tratamentos fotobiológicos (SIBATA *et al.*, 2000). Porém, a sua grande estrutura hidrofóbica promove a auto-agregação com forte tendência de formação de dímeros, especialmente em meio aquoso, ou seja, em ambiente fisiológico. A auto-agregação de fotossensibilizadores diminui a sua eficiência terapêutica devido a redução na quantidade de EROs produzidas (HUANG *et al.*, 2007; SIBATA *et al.*, 2000).

Em vista destes fatos, o desenvolvimento de novos sistemas de liberação de fármacos que podem eficientemente carregar a  $ZnPcSO_4$  na sua forma não agregada poderia permitir seu uso clínico em TFD. Até o momento, poucos estudos têm se centrado no desenvolvimento e avaliação de veículos novos para a incorporação desta classe de metaloftalocianinas (KAHLWEIT *et al.*, 1987; KOLÁROVÁ *et al.*, 2003).

A técnica de montagem camada a camada, chamada de *layer-by-layer* (LbL) é baseada na deposição de filmes finos de polieletrólitos de cargas opostas sobre a superfície de sistemas nanoparticulados (DECHER; HONG; SCHMITT, 1992).

O recobrimento LbL pode ser usado como um meio de direcionar os sistemas nanoparticulados e para reduzir a taxa de liberação inicial do fármaco incorporado nas nanopartículas (PATERNO; MATTOSO; DE OLIVEIRA, 2001).

Neste estudo, um novo sistema de nanopartículas, composto de PLGA e polieletrólitos foi preparado pela técnica de dupla emulsificação/evaporação do solvente pela subsequente deposição de filmes finos de polieletrólitos, para produzir nanopartículas de PLGA polieletrólítica para encapsular a  $ZnPcSO_4$  como fotossensibilizador ativo em TFD. O desenvolvimento de novos

sistemas nanoestruturados visa contribuir para a promoção de áreas consideradas estratégicas para o desenvolvimento da economia e de grande impacto social, entre elas as nanotecnologias.

### 1.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto foi desenvolver um novo sistema nanotecnológico de liberação controlada de fármacos, utilizando nanopartículas de PLGA polieletrólítica para encapsular a  $\text{ZnPcSO}_4$  como fotossensibilizador ativo em TFD.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar nanopartículas de PLGA pelo método de dupla emulsificação/evaporação do solvente;
- Realizar a deposição de filmes finos de polieletrólitos, para produzir nanopartículas de PLGA polieletrólíticas;
- Encapsular o fármaco zinco ftalocianina tetrassulfonada ( $\text{ZnPcSO}_4$ ) em um sistema de nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico);
- Caracterizar as nanopartículas fabricadas por microscopia eletrônica de varredura;
- Caracterizar o sistema nanoparticulado por técnicas no estado estacionário;
- Avaliar o comportamento citotóxico e fotobiológico das nanopartículas de PLGA polieletrólíticas utilizando os protocolos de TFD.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMEDICINA

A nanotecnologia é considerada uma tecnologia emergente, sendo um campo inovador da ciência que tem a finalidade de estudar a manipulação da matéria numa determinada escala atômica e/ou molecular, lidando com estruturas nanoscópicas, em uma escala conhecida como nano ( $10^{-9}$  m = 1 nm), onde as dimensões não excedam 100 nm. Ou seja, a nanotecnologia engloba o projeto, caracterização, produção e aplicações em nanoescala (ZARNEGAR; SAFARI, 2014).

A nanotecnologia chega em uma era na qual o seu beneficiamento entre indústrias, instituições não governamentais e meio acadêmico irão acelerar o desenvolvimento de novos produtos em escala mundial. Diante disso, existirá um momento em que o atual e tradicional modelo de negócios em larga escala precisarão ser revisados, pois o valor agregado dos nanomateriais e seus valores sociais serão atrelados na diminuição de impactos ambientais nos processos de manufatura, mais limpos, eficientes a nível de consumo de energia e, posteriormente, com o uso de novas fontes renováveis (IRFAN, 2013).

Já existe nos mercados produtos comercializados em nanoescala, como dióxido de ouro, prata, cobre e titânio que, quando adicionados aos materiais de tinta e plástico (por exemplo), melhoram seu desempenho. Existem também alguns produtos que estão em fase final de testes e prestes a serem comercializados, como nanotubos de carbono (MONTES *et al.*, 2016).

A nanotecnologia vem recebendo atualmente um considerável destaque em várias áreas como ciência da computação, física, química, biologia, engenharia dos materiais e principalmente na medicina, em tratamentos e terapias relacionadas ao câncer (JAWAID; SWAIN, 2017).

Ao longo dos anos, os avanços da medicina proporcionaram a junção e aplicação de nanotecnologias em vários estudos e tratamentos, tornando-se um mercado com grande potencial no desenvolvimento de fármacos potencialmente auxiliares em tratamentos de doenças, como por exemplo o câncer (ECHEVARRÍA-CASTILLO, 2013).

A nanotecnologia atrelada com a medicina (nanomedicina) busca constantemente aprimorar conhecimentos e descobrir novas nanotecnologias, possibilitando meios de um diagnóstico precoce até o devido tratamento, reduzindo risco para o organismo do paciente, como efeitos colaterais (CANCINO; MARANGONI; ZUCOLOTTI, 2014).

Além disso, toda essa nanotecnologia envolvida permite nos dias de hoje nanodiagnósticos capazes de identificar doenças em estados iniciais ao mais avançado, estudando interações em nanoescala (HEHENBERGER, 2015).

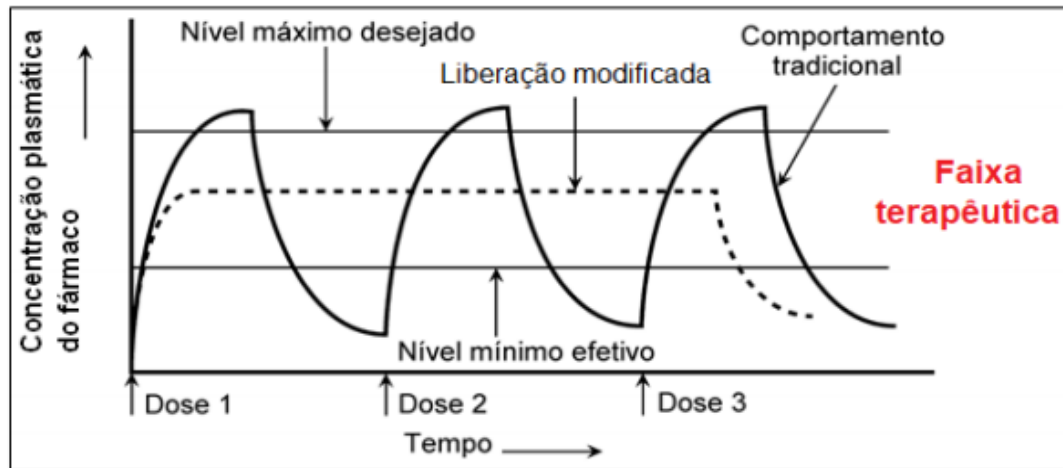
## 2.2 SISTEMAS CARREGADORES DE FÁRMACOS

Os chamados de *drug delivery systems* – DDS, também conhecidos como sistemas carregadores de fármacos, são denominados como processos em que um determinado princípio ativo em sua formulação farmacêutica se torna disponível para ser absorvido pelo organismo (CAMPOS, 2013). Os sistemas de liberação dos fármacos são divididos em tradicionais e modificados. Nos sistemas tradicionais, o fármaco é liberado de modo que seja absorvido completamente pelo organismo, se caracterizando pela formação de um pico plasmático após a sua administração e posteriormente uma declinação. Como exemplo, podemos citar os comprimidos mais comuns, como os mastigáveis, efervescentes, sublinguais, desintegráveis e bucais. Os níveis que podem ser atingidos são dependentes das doses que são administradas, além de cada fármaco possuir uma faixa particular de ação terapêutica (GOLAN; TASHJIAN; ARMSTRONG, 2009).

O desenvolvimento de sistemas de liberação modificada de fármacos se deu na década de 60, com o desenvolvimento de microcápsulas com tamanhos entre 5 a 2000  $\mu\text{m}$ . Tempos depois, o sistema de microencapsulamento serviu como modelo para o desenvolvimento de sistema em escala nanométrica (igual ou inferior a um bilionésimo de metro), tendo como objetivo o transporte de fármacos e direcioná-los para os órgãos e tecidos de sítios específicos (DELGADO, 2013).

Os sistemas de liberação dos fármacos modificados, são descritos como sendo sistemas desenvolvidos a fim de possibilitar um melhor aproveitamento do fármaco pelo organismo, em comparação com os sistemas convencionais. Ou seja, ter um sistema que possa manter a concentração plasmática do fármaco dentro da faixa terapêutica. Além de promoverem a otimização de distribuição do composto farmacológico, evitam também flutuações indesejáveis na sua concentração, e assim permitir uma melhor biodisponibilidade e melhorar o perfil farmacocinético, a velocidade de liberação deste fármaco, o local e duração deste fármaco, além de exercer influência sobre os efeitos colaterais de seu uso (Figura 1) (GOLAN; TASHJIAN; ARMSTRONG, 2009).

Figura 1 - Perfis da concentração plasmática de fármaco em função do tempo.

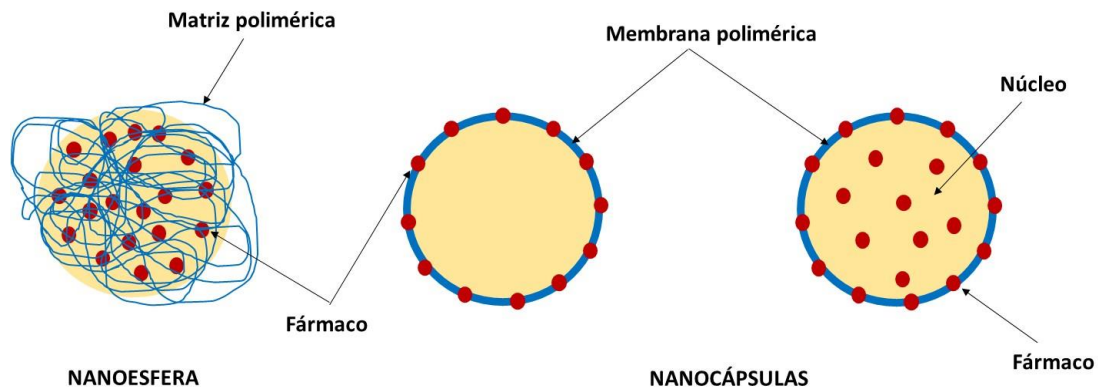


Fonte: Golan; Tashjian; Armstrong (2009)

### 2.3 NANOPARTÍCULA DE PLGA

As nanopartículas poliméricas podem ser classificadas de acordo com a sua morfologia em nanoesferas ou nanocápsulas, no qual sua estrutura é definida pela utilização de determinados componentes na formulação e a técnica de preparo. As nanoesferas possuem uma estrutura matricial, onde os fármacos estão uniformemente dispersos. Por outro lado, as nanocápsulas se apresentam na forma de um reservatório, onde um invólucro sólido circunda um núcleo composto por substâncias que podem estar em estado líquido ou semissólido em temperatura ambiente (Figura 2). Ambas podem ser utilizadas no processo de veiculação do fármaco, onde estes podem estar adsorvidos na superfície da partícula ou aprisionados no seu interior (DELGADO, 2013).

Figura 2 - Estrutura morfológica das nanopartículas poliméricas: nanoesfera e nanocápsula.

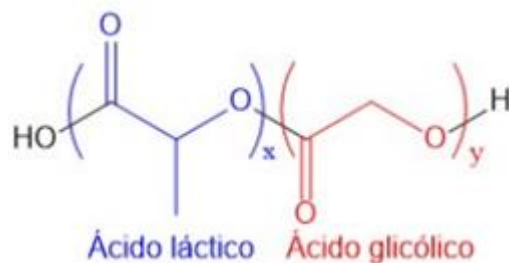


Fonte: Elaborado pela autora.

Ao se realizar o preparo de nanopartículas com polímeros, os comumente utilizados podem ser de origem natural, tais como alginato, albumina, gelatina e quitosana, ou de origem sintética, como poli (ácido lático – PLA), poli- $\epsilon$ -caprolactona (PCL) e poli (ácido lático-co-ácido glicólico – PLGA) (UEJO *et al.*, 2013).

O PLGA (poli ácido lático-co-ácido glicólico), é caracterizado como sendo um copolímero dos monômeros ácido lático e ácido glicólico, no qual tem despertado grande interesse na área de pesquisas para a utilização em sistemas de liberação de fármacos, devido a sua capacidade de modificar a distribuição do fármaco, proporcionando o aumento de sua concentração no sítio de ação que se deseja, redução dos efeitos tóxicos, além da biocompatibilidade e resistência mecânica (CRUCHO; BARROS, 2017).

Figura 3 - Estrutura química do poli (ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA).



Fonte: Makadia e Siegel (2011).

Além disso, as nanopartículas de PLGA permitem elevado grau de eficiência no encapsulamento de fármacos lipofílicos, e o recobrimento polimérico do fármaco proporciona uma proteção de possíveis degradações e redução de irritações que podem ser ocasionadas devido este processo. Por apresentar tamanho reduzido, essas nanopartículas possuem diversas vias de administração, inclusive endovenosa, não apresentando riscos de embolia (por exemplo) devido sua estrutura nanométrica e sendo incapaz de obstruir vasos sanguíneos (WACKER, 2013).

Existem diversas técnicas de preparação das nanopartículas poliméricas, no qual são responsáveis para a definição do tamanho, eficiência de encapsulamento do fármaco, e do tipo de estrutura formada, sendo esta nanocápsula ou nanoesfera (ZHAO *et al.*, 2014).

De uma forma geral, o preparo destas nanopartículas podem ser classificadas em dois tipos:

- Polimerização de monômeros: Processo químico na qual resulta na formação de macromoléculas denominadas de polímeros, por mediação de moléculas menores, os monômeros;
- Polímeros pré-formados: Produzidas por emulsificação-evaporação do solvente, por emulsificação-difusão do solvente ou *salting-out* (insolubilização da proteína em decorrência de considerável aumento de força iônica).

A técnica de polimerização de monômeros resulta na formação de resíduos tóxicos que são difíceis de purificar. Com isso as técnicas utilizadas com os polímeros pré-formados estão sendo as mais utilizadas por pesquisadores para no desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos nanoestruturados (LI, Q. *et al.*, 2017).

No método de emulsificação/evaporação, utilizado para desenvolver as nanopartículas fabricadas neste trabalho de pesquisa, o PLGA é dissolvido em um solvente imiscível em água e volátil, como o diclorometano (DCM) ou clorofórmio (DINARVAND *et al.*, 2011).

As etapas básicas do processo são: (i) emulsificação de um fase dispersa de PLGA em uma solução aquosa contendo emulsificante com exposição a uma fonte de alta energia, como um dispositivo ultrassônico ou homogeneizador de alta rotação, (ii) evaporação ou difusão de solvente a partir de gotículas de emulsão no ambiente aquoso, (iii) solidificação de gotículas de emulsão no interior da nanopartículas de PLGA (SAH; SAH, 2015).

## 2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA

As civilizações mais antigas, entre eles indianos, egípcios, gregos e chineses, faziam o uso da luz solar ("helioterapia") para o tratamento de algumas doenças, como psoríase, raquitismo, vitiligo e em alguns casos até mesmo contra câncer de pele. Com o passar dos anos, mais precisamente no final do século 18, foi utilizada uma luz vermelha artificial no tratamento de tuberculose cutânea e varíola, que foi desenvolvida pelo cientista dinamarquês Niels Finsen. Por intermédio deste tratamento com luz vermelha, que o cientista Niels Finsen recebeu o Prêmio Nobel em 1903 (SCHERER *et al.*, 2016).

No ano de 1904, o aluno Oscar Raab relatou a seu professor Herman von Tappeiner que a combinação de luz com laranja de acridina poderia ser um potencial destruidor de um organismo vivo, chamado paramécio. Já em 1905, o professor Herman von Tappeiner descreveu que, após experimentos, o oxigênio seria essencial para induzir a morte celular observada no experimento do ano anterior com o parasita paramécio. Posteriormente, esses ensaios clínicos utilizando vermelho de Magdala e Eosina foram relatados como fotossensibilizadores (MACDONALD; DOUGHERTY, 2001).

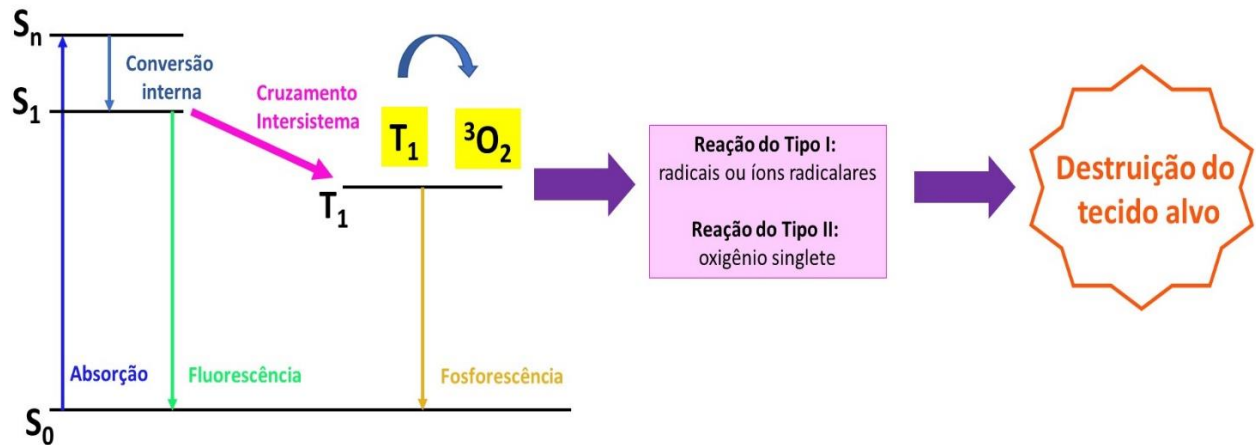
A terapia fotodinâmica (TFD) tem um dos principais desafios a ser superado é promover a administração do fotossensibilizador (FS) ao tecido alvo. A maioria dos FS formam agregados em meios aquosos devido sua elevada hidrofobicidade, afetando suas propriedades fotofísicas, químicas e biológicas, e diminuindo sua biodisponibilidade e a ação fotodinâmica (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

A fim de melhorar a disponibilidade dos FS na forma monomérica e superar o problema da agregação, seria combiná-los com nanomateriais, melhorando a eficiência da TFD no que diz respeito ao direcionamento dos FS ao tecido alvo e também superar possíveis inconvenientes associados a estabilidade (YIN *et al.*, 2015).

A TFD é definida como uma técnica terapêutica realizada em duas etapas, onde a utilização da droga (tópica, sistêmica ou sensibilizante) é seguida por uma irradiação de uma luz visível, com o objetivo de causar destruição seletiva de um tecido. Os fotossensibilizantes que são formados endogenamente ou administrados exogenamente são ativadas pela luz e com isso transferem a energia ao oxigênio molecular, no qual são geradas espécies reativas de oxigênio (ERO's), a fim de induzir a morte celular (DE OLIVEIRA *et al.*, 2015).

A TFD tem início com o fornecimento de energia para o sistema por meio de irradiação do tecido fotossensibilizado (MODESTO *et al.*, 2014). A molécula do FS absorve esta energia, passando do estado fundamental ( $S_0$ ) para um estado mais energético ( $S_n$ ), onde ambos estão em estados singletos. Por meio de uma conversão interna, existe a possibilidade de um decaimento até o menor nível vibracional dentro do estado excitado ( $S_1$ ). Com esta condição, a molécula pode decair para um estado fundamental, emitindo fluorescência ou ocorrendo um cruzamento intersistema, onde a molécula do FS pode ir para um estado tripleto excitado ( $T_1$ ). Neste estado, o mesmo pode decair para um estado fundamental, emitindo fosforescência, interagindo com biomoléculas adjacentes, onde os efeitos esperados da TFD acontecem (Figura 4) (DING *et al.*, 2018).

Figura 4 - Diagrama de Jablonski adaptado para descrever as possíveis trajetórias após a excitação da molécula de FS.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para compreendermos melhor a TFD, é preciso definir as interações e propriedades de 3 elementos envolvidos nestes processos fotoquímicos: Luz, corante e oxigênio (BLOISE *et al.*, 2017; KAWCZYK-KRUPKA *et al.*, 2018).

## 2.5 CORANTES

Os corantes são classificados como substâncias que apresentam grande capacidade de absorção de luz na região do espectro visível. Por apresentarem esta característica, os corantes podem ativar processos fotoquímicos. Existem alguns exemplos, como no processo de fotossíntese que ocorre com a ação da clorofila. Outros exemplos de corantes são: acridina, azul de metileno, eosina, verde de malaquita, entre outros (BASSIR *et al.*, 2013).

No processo da TFD, os corantes são denominados por fotossensibilizadores, devendo ser um composto não tóxico e estes são subdivididos nos seguintes grupos: azino-catiônicos, fenotiazínicos, cianinas, macrocíclicos, ftalocianinas, psoralens, porfirinas, perilenequinonóides e combinações de corantes (SOUZA, 2011).

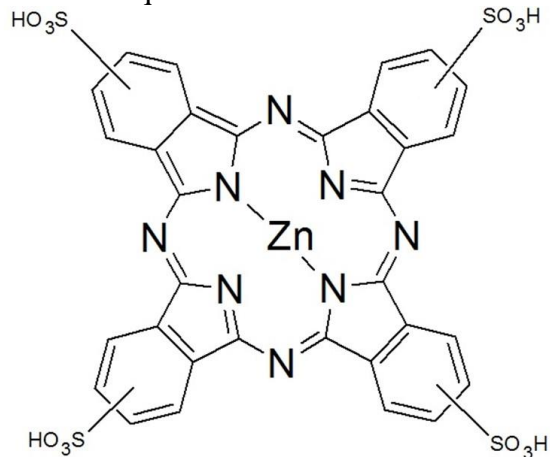
A ftalocianina (Pc), é um tipo de corante molecular, que tem sido amplamente utilizada como fotossensibilizador para terapia fotodinâmica (TFD) por diversos motivos, como apresentar longos comprimentos de onda de absorção ( $\lambda_{\max} > 660 \text{ nm}$ ), altos coeficientes de extinção molar ( $\epsilon_{\max} > 105 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) e propriedades fotofísicas e fotoquímicas ajustáveis por meio de modificações

químicas fáceis (BONNETT, 1995). Até o momento, uma Pc (Alumínio Pc, Photosens®, Rússia) foi aprovada para uso clínico e duas Pc (Silicon Pc, Pc4®, EUA e Zinco Pc, Atualmente, a Photocyanine®, China) chegou a testes clínicos (LI, X. *et al.*, 2018).

Ao considerar fotossensibilizadores para uso clínico, várias características são importantes. O candidato a fotossensibilizador deve produzir com eficiência espécies reativas de oxigênio, apresentar absorção máxima em comprimentos de onda que são facilmente propagadas através de tecidos (> 630 nm) e não causar fotossensibilização cutânea prolongada (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

A Zinco Ftalocianina Tetrassulfonada (ZnPcSO<sub>4</sub>), Figura 5, um derivado de ftalocianina, solúvel em água, apresenta um pico de absorção na região de 600 nm, indicado para tratamento fotobiológicos, uma vez que nesta região há ótima penetração da luz no tecido (HUANG *et al.*, 2007).

Figura 5 - Representação da estrutura química da Zinco Ftalocianina Tetrassulfonada (ZnPcSO<sub>4</sub>).



Fonte: Elaborado pela autora.

Porém, essa molécula possui um fator limitante atribuído a sua elevada massa molar (898,15 g.mol<sup>-1</sup>), que dificulta a penetração nos tecidos alvos (LIU *et al.*, 2007). Além deste fator, a autoagregação, atribuída a sua extensa estrutura hidrofóbica, propicia a formação de dímeros em ambiente aquoso (meio fisiológico), o que reduz a sua eficiência terapêutica, pois acarreta uma diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio (SIBATA *et al.*, 2000).

A entrega eficiente de fotossensibilizadores no tecido alvo pode ser direcionada pelo uso de sistemas de liberação de fármacos, como lipossomas, dendrímeros, nanocápsulas e nanopartículas

poliméricas (MESQUITA *et al.*, 2018). O uso seletivo de um destes sistemas pode permitir o carregamento da ZnPcSO<sub>4</sub> na sua forma não agregada, maximizando sua ação terapêutica.

## 2.6 LAYER BY LAYER

A técnica de deposição camada por camada, mais conhecida como deposição *layer-by-layer* (LBL) se destaca por ser uma técnica simples, com baixo custo, gerando perda mínima de material e principalmente não agredindo o meio ambiente, visto que os materiais são preparados em soluções aquosas (COSTA; ALATORRE-MEDA; MANO, 2015).

Langmuir discutiu o fato de que a adsorção de íons em uma superfície é limitada a apenas uma monocamada, onde demonstrou uma camada de íons tório sendo adsorvida em uma monocamada de estearato de bário em água. A adsorção de partículas coloidais em um substrato com carga oposta foi demonstrada por Iler, que em 1966 conseguiu desenvolver a técnica de adsorção de multicamadas de partículas coloidais com carga oposta (sílica e alumina) (ANANDHAKUMAR; GOKUL; RAICHUR, 2016).

Decher e colaboradores estabeleceram a técnica de deposição LbL após o sugestivo relato de Iler, onde descreveram a adsorção com camadas alternadas de poliânions e polications em um substrato sólido com superfície eletricamente carregada (DECHER; 1997).

Cada ciclo de deposição produz uma estrutura de polímero complexado e interpenetrado, denominada bicamada e esta notação é usada comumente na seguinte equação 1:

$$(\text{Poly1 X} / \text{Poly2 Y})_n \quad (1)$$

Onde, Poly1 e Poly2 referem-se a abreviação do nome de cada polímero usado, X e Y referem-se ao pH das soluções poliméricas utilizadas durante a montagem multicamada e n refere-se ao número de bicamadas depositadas (COSTA; ALATORRE-MEDA; MANO, 2015).

Essas etapas podem ser repetidas quantas vezes forem necessárias, e durante esses processos uma grande variedade de polieletrólitos, proteínas, DNA ou matérias carregadas podem ser combinados, tais como substratos estruturalmente elaborados podem funcionalizar nanopartículas (HSU; HAGERMAN; HAMMOND, 2016).

As forças motrizes da deposição de polieletrólitos podem incluir interações eletrostáticas, bem como não eletrostáticas, tais como hidrofobicidade, ligações de hidrogênio e forças de Van der Waals (CAMPOS; FRACETO; FERREIRA, 2018).

Em capsulas PEM (do inglês *Polyelectrolyte multilayer*) ou filmes, foi demonstrado que a liberação de fármaco é uma função da força iônica, pH e/ou espessura das multicamadas. A absorção do fármaco no PEM é de grande interesse no campo de biomateriais. De modo particular, filmes dilatáveis e mais grossos podem ser usados como reservatório de compostos ativos (HSU; HAGERMAN; HAMMOND, 2016).

Diferentes estratégias de liberação controlada desses filmes e fármacos estão sendo utilizadas, incluindo a difusão, o desencadeamento ambiental e a degradação hidrolítica. Cada uma dessas estratégias pode gerar perfis de liberação interessantes, mas também estão sujeitas às suas condições aquosas de processamento. Tipicamente, drogas apresentam ótimas condições de montagem porque o pH ou a força iônica facilitam sua afinidade com o filme, porém as vezes, podem ocorrer a liberação indesejável do fármaco. Isso pode ser problemático, especialmente durante o processamento de várias etapas, fazendo com que a escolha de como o medicamento é incorporado seja um fator importante na carga final do medicamento (WANG *et al.*, 2016).

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica na Universidade do Vale do Paraíba (Univap) e o material utilizado foi financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ #426625/2016-1) e pela Univap.

#### 3.1 MATERIAIS

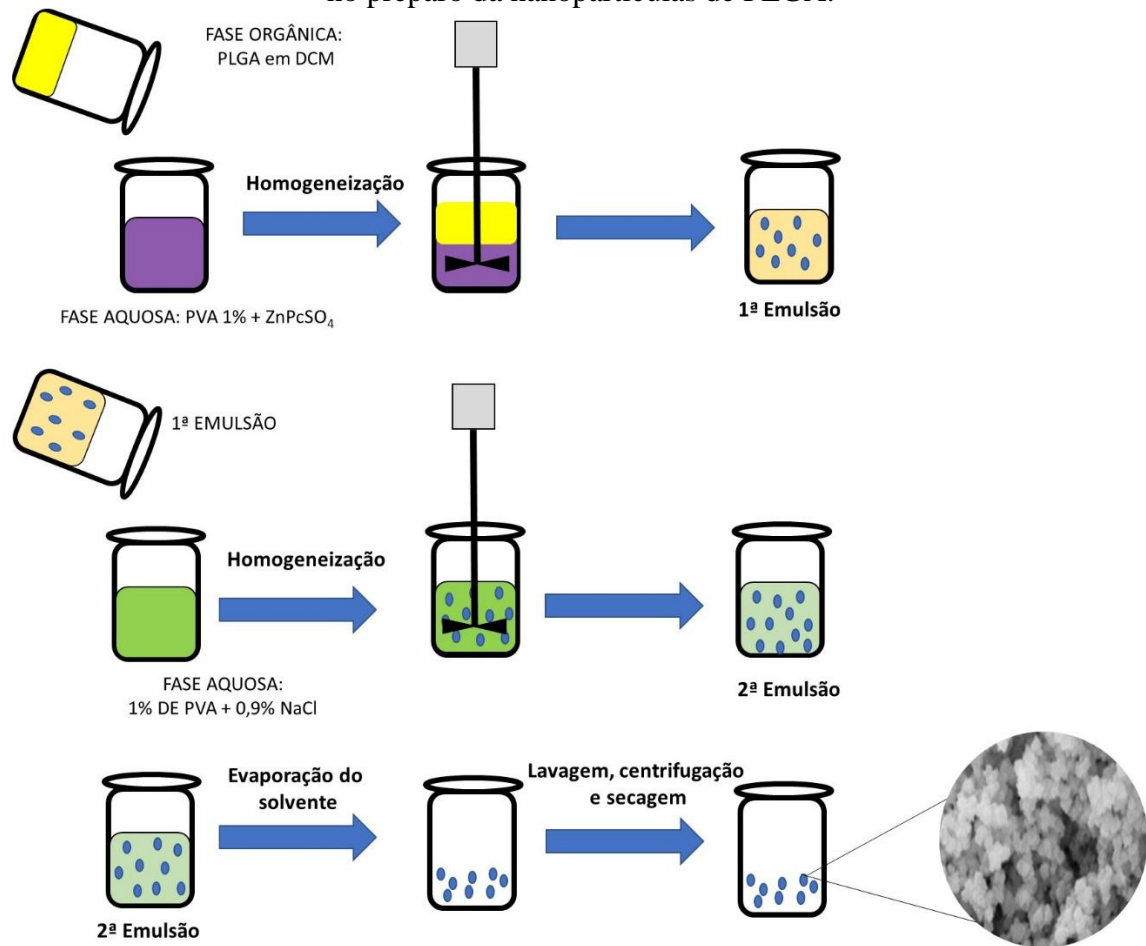
Poli ácido lático-co-ácido glicólico (PLGA), poli(estireno sulfonato de sódio) (PSS), poli(alilamina hidrocloreada) (PAH) e Zinco Ftalocianina Tetrassulfonada ( $\text{ZnPcSO}_4$ ) foram adquiridos da Sigma-Aldrich. O álcool polivinílico (PVA) utilizado foi da empresa Vetec. Os solventes utilizados foram da marca Synth.

#### 3.2 FABRICAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE PLGA POLIELETROLÍTICAS

Nanopartículas contendo  $\text{ZnPcSO}_4$  foram preparadas a partir de PLGA de acordo com a metodologia descrita anteriormente por Sohier e colaboradores (2003) com modificações (SOHIER *et al.*, 2003). Resumidamente, 100 mg de PLGA foram dissolvidos em diclorometano (DCM). Esta solução foi adicionada a uma solução aquosa de PVA (álcool polivinílico) (3%, p/p) contendo 0,5 mg de  $\text{ZnPcSO}_4$ , sob mistura em um Ultraturrax T18 (Ika, Alemanha), a 15.000 rpm. Essa emulsão água/óleo formada foi transferida para uma solução aquosa contendo 1% de PVA e 0,9 % de NaCl sob mistura no Ultraturrax T18 por 1 minuto.

O solvente (DCM) foi evaporado da emulsão água/óleo/água formada à temperatura ambiente (25°C) por 8 h, sob agitação magnética. Nanopartículas carregadas com  $\text{ZnPcSO}_4$  foram purificadas por 30 min de centrifugação a 3000 rpm e ressuspensão em água. As amostras foram armazenadas a 25 °C antes análise (Figura 6).

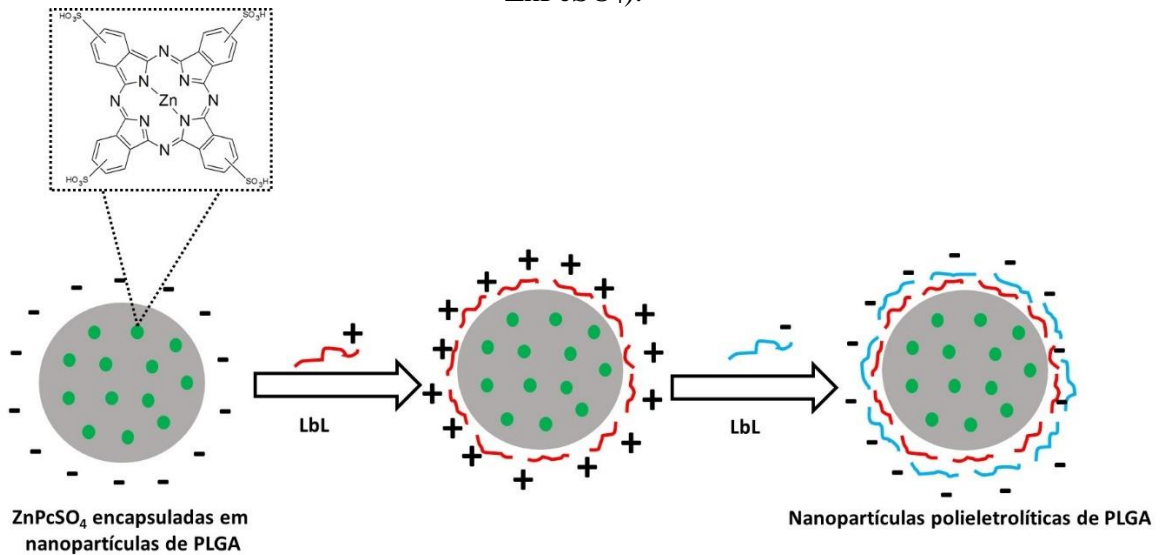
Figura 6 - Fluxograma da metodologia de dupla emulsificação/evaporação do solvente utilizado no preparo da nanopartículas de PLGA.



Fonte: Elaborado pela autora.

As soluções de PAH e PSS ( $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) utilizadas para a montagem da bicamada polieletrólítica foram preparadas em água DI. As nanopartículas de PLGA foram suspensas em água DI por meio de sonicação durante 10 min antes da montagem da LbL. As partículas foram revestidas com uma camada de {PAH/PSS}, em que cada tempo de reação da etapa de adsorção foi de 20 min, seguido por lavagem tripla com água deionizada (Figura 7).

Figura 7 - Esquema de preparação das nanopartículas de PLGA polieletrólíticas (NP-PLGA/ $\text{ZnPcSO}_4$ ).



Fonte: Elaborado pela autora.

### 3.3 CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA

A morfologia externa das NP-PLGA/ $\text{ZnPcSO}_4$  foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento EVO-MA10 (Zeiss-Alemanha).

### 3.4 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE NANOPARTÍCULAS DE NP-PLGA/ $\text{ZnPcSO}_4$

O tamanho de partícula e o potencial zeta das NP-PLGA/ $\text{ZnPcSO}_4$  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  $173^\circ$  à temperatura ambiente. Para o teste de estabilidade, a distribuição de tamanho e o potencial zeta da amostra foram coletadas em diferentes tempos de armazenamento por 90 dias.

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

As propriedades fotofísicas das NP-PLGA/ ZnPcSO<sub>4</sub> 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 – 10 µmol.L<sup>-1</sup> pelo método espectrofotométrico para estabelecer a linearidade do método proposto e comprovar a lei de lambert-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.

### 3.6 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 seguinte equação 2, conforme relatado na literatura (KOLLURU *et al.*, 2013).

$$Y (\%) = \{[\text{peso das nanopartículas}] / \text{peso de polímero e FS}\} \times 100 \quad (2)$$

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

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

A quantidade de fármaco adsorvido ou encapsulado nas nanopartículas polieletrólíticas de PLGA foi determinada a partir da quantidade de ZnPcSO<sub>4</sub> livre no sobrenadante após o processo de centrifugação, determinado por espectroscopia de absorção por UV-vis. A eficiência de associação/encapsulamento de ZnPcSO<sub>4</sub> nas nanopartículas polieletrólíticas de PLGA foi determinada a partir da seguinte equação (3):

$$EE (\%) = \{([\text{peso do ZnPcSO}_4 \text{ total} - \text{peso do ZnPcSO}_4 \text{ no sobrenadante}]) / (\text{peso do ZnPcSO}_4 \text{ total})\} \times 100 \quad (3)$$

Uma curva de calibração padrão do pico máximo de absorção (a 646 nm) versus concentração, usando concentrações conhecidas de ZnPcSO<sub>4</sub> em etanol foi plotada para determinar ZnPcSO<sub>4</sub> livre.

### 3.8 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 polieletrólíticas de PLGA, 5,0 mg foram dispersas em solução tampão 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 ZnPcSO<sub>4</sub> no sobrenadante foi determinada pela absorbância UV-Vis a 646 nm, usando uma curva de calibração de ZnPcSO<sub>4</sub> puro em etanol. Os dados foram relatados como média ± DP, com base em medidas triplicadas.

### 3.9 CULTURAS DE CÉLULAS

Neste trabalho, os ensaios biológicos foram avaliados *in vitro* usando a linha de células de câncer de melanoma de camundongo B16-F10 (ATCC 6322). A resposta da TFD foi avaliada com base na aplicação de um diodo emissor de luz (LED), com potência de saída de 0,2 W e comprimento de onda de pico de 660 nm, que cobre a banda espectral correspondente à absorbância das ftalocianinas. Os testes de citotoxicidade fornecem informações importantes sobre o impacto à saúde dos seres humanos, enquanto expostos a materiais nanodimensionados por via oral, cutânea ou por inalação.

Culturas de monocamada foram cultivadas no meio essencial mínimo (DEMB) *Eagle da Dulbelco Eagle* com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina-estreptomicina e 1% de aminoácidos não essenciais. As células foram mantidas em incubadora a 37 °C e atmosfera úmida a 5% de CO<sub>2</sub>. Para o teste *in vitro* foram utilizadas microplacas de 24 poços.

### 3.10 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS NP-PLGA/ ZnPcSO<sub>4</sub>

Para avaliar o efeito citotóxico intrínseco das NP-PLGA/ ZnPcSO<sub>4</sub>, as células foram mantidas no escuro e incubadas com uma mistura de meio fresco e nanopartículas polietrolíticas de PLGA encapsuladas com o FS em concentrações finais de 1,0; 3,0; e 5,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  por 3 h. Após a incubação, o meio contendo a dispersão das nanopartículas foi descartado e as células foram lavadas duas vezes com solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS), seguida de re-incubação (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) em meio fresco por mais 24 horas, até a realização do ensaio de viabilidade celular descrito na Seção 3.10. As células de controle foram incubadas apenas com meio de cultura (células não tratadas) ou uma mistura de meio e nanopartículas não carregadas, ambas no escuro. Os experimentos de toxicidade em condições escuras foram realizados em triplicata, com oito poços para cada concentração de ZnPcSO<sub>4</sub> nanoencapsulado. Também foi testado as mesmas concentrações de FS em sua forma livre, ou seja, quando não associado a um sistema de liberação.

### 3.11 ENSAIO DE FOTOCITOTOXICIDADE DAS NP-PLGA/ZnPcSO<sub>4</sub> EM CÉLULAS DE MELANOMA DE CAMUNDONGO

Para avaliar o efeito fototóxico de ZnPcSO<sub>4</sub> nanoencapsulado, as células de melanoma foram tratadas com meio contendo NP-PLGA/ ZnPcSO<sub>4</sub> a 1,0; 3,0; e 5,0  $\mu\text{mol.L}^{-1}$  (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C). Após 3 h de incubação, o meio carregado com ZnPcSO<sub>4</sub> nanoencapsulado foi removido e as células lavadas duas vezes com PBS. As células foram expostas a doses de 10 J.cm<sup>-2</sup>. Após as irradiações, o meio incolor foi removido e as células incubadas novamente (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) em meio fresco por 24 horas adicionais até que o ensaio de viabilidade celular MTT seja conduzido, conforme descrito na Seção 3.10. As células de controle foram incubadas apenas com o meio de cultura e sem irradiação (células não tratadas). O ensaio de fotocitotoxicidade foi realizado em triplicata, com oito poços para cada dose de luz. Também foi testado as mesmas concentrações de FS em sua forma livre, ou seja, quando não associado a um sistema de liberação.

### 3.12 ENSAIO DE VIABILIDADE POR MTT

O método de proliferação celular MTT foi empregado para avaliar a viabilidade celular após os ensaios citotóxicos ou fotocitotóxicos. Resumidamente, alíquotas de 80  $\mu\text{L}$  de solução MTT (5  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) e 420  $\mu\text{L}$  de meio sem vermelho de fenol foram adicionados a cada poço. As células foram, então, incubadas por 4 h, a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  para permitir a reação de formação de formazan. Após a incubação, o meio contendo solução de MTT foi removido e os cristais de formazan formados foram dissolvidos em propano-2-ol. A densidade óptica foi determinada por meio de um espectrofotômetro com filtro de 570 nm. Os resultados são apresentados como a porcentagem de sobrevivência, tomando o controle (células não tratadas) como 100%.

### 3.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

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

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

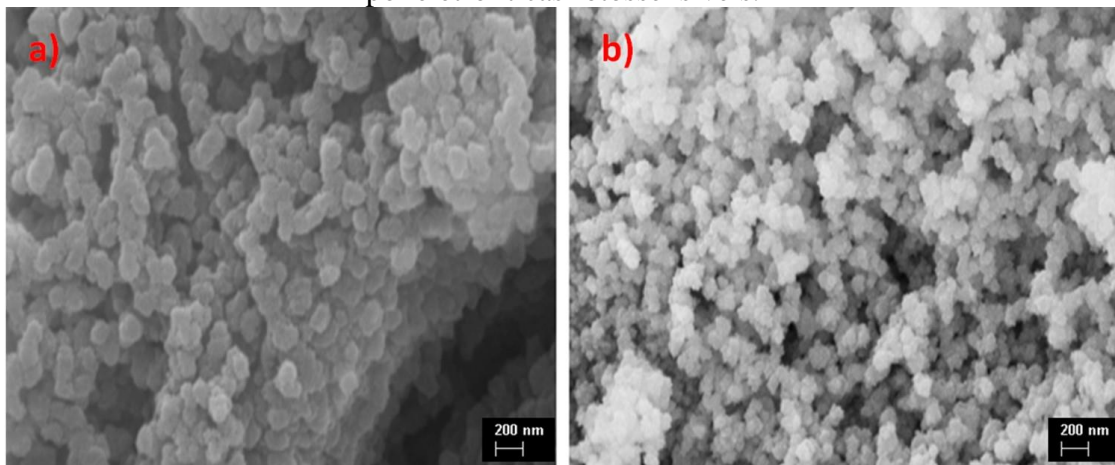
### 4.1 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NANOPARTICULADO

Nanopartículas biodegradáveis de PLGA têm sido amplamente explorados como carreadores de macromoléculas como proteínas, peptídeos, vacinas, genes, antígenos e fatores de crescimento. Estes dispositivos são produzidos principalmente pela técnica de simples emulsão ou dupla emulsão seguida de evaporação do solvente. Apesar das formulações alternativas já disponíveis no mercado, pesquisas nessa área avançou bastante devido às vantagens do PLGA sobre outros sistemas. A literatura cita muitas vantagens e desvantagens dos sistemas de entrega de PLGA e baseados em PLGA para entrega de medicamentos macromoleculares (BOSQUILLON *et al.*, 2001; BRADEN *et al.*, 2007).

NP-PLGA/ZnPcSO<sub>4</sub> foram preparados com sucesso pelo método de dupla emulsificação/evaporação do solvente. Soppimath e colaboradores (2001) sugerem que o método de encapsulamento deve produzir nanopartículas com alta eficiência de carregamento de medicamentos para reduzir a quantidade de administração necessária para a eficácia do tratamento (SOPPIMATH *et al.*, 2001).

Uma combinação de par de policação /poliânion (PAH / PSS - policação fraco/poliânion forte) foi usado para formar um revestimento LbL em torno de nanopartículas de PLGA de 200 nm (Figura 8).

Figura 8 – Micrografia: a) das nanopartículas de PLGA; b) das nanopartículas de PLGA polieletrólíticas fotossensíveis.

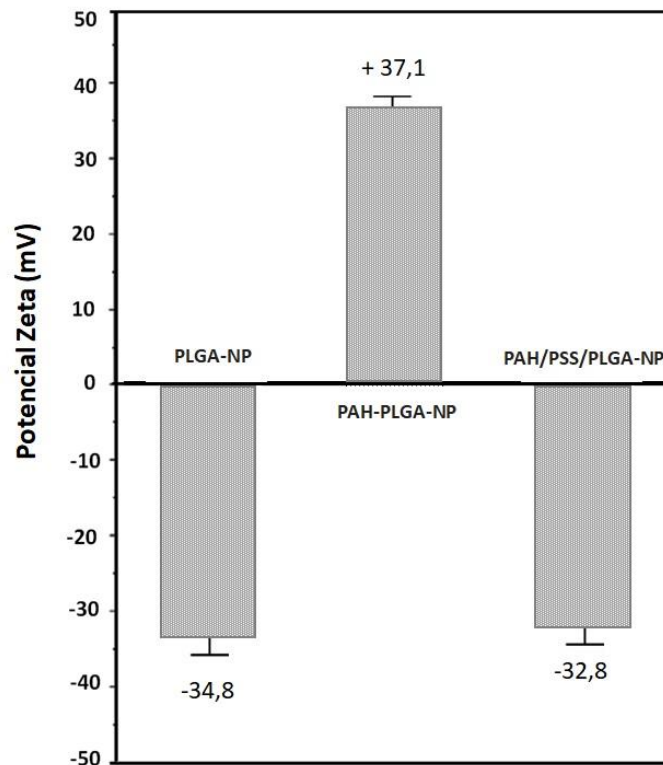


Fonte: Elaborado pela autora.

A literatura descreve que o processo de recobrimento de nanopartículas com filmes de polieletrólitos em concentrações acima de  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$ , ocasiona agregação irreversível de partículas devido à fraca dispersão da solução de polieletrólito (CHAI *et al.*, 2017). Tan e colaboradores descobriram que multicamadas espessas poderiam reduzir significativamente a liberação inicial do medicamento a partir de um nanogel (TAN *et al.*, 2003). Para obter um perfil de liberação satisfatório,  $2 \text{ mg.mL}^{-1}$  do polieletrólito foi selecionado como a concentração ideal para experimentos subsequentes.

A superfície das nanopartículas de PLGA não revestidas é negativa com uma carga superficial de  $-34,8 \text{ mV}$ . Com a deposição das camadas de polieletrólitos nas nanopartículas de PLGA ocorre a mudança no potencial de superfície para  $+37,1 \text{ mV}$  para a camada PAH e  $-32,8 \text{ mV}$  para o camada de PSS (Figura 9). A mudança óbvia do potencial zeta indica alternância bem-sucedida na deposição do polication PAH e do poliânion PSS diretamente nas nanopartículas de PLGA.

Figura 9 - Potencial zeta para nanopartículas de poli (ácido láctico-co-glicólico) revestidas com PAH e PSS (n = 3; média  $\pm$  desvio padrão).

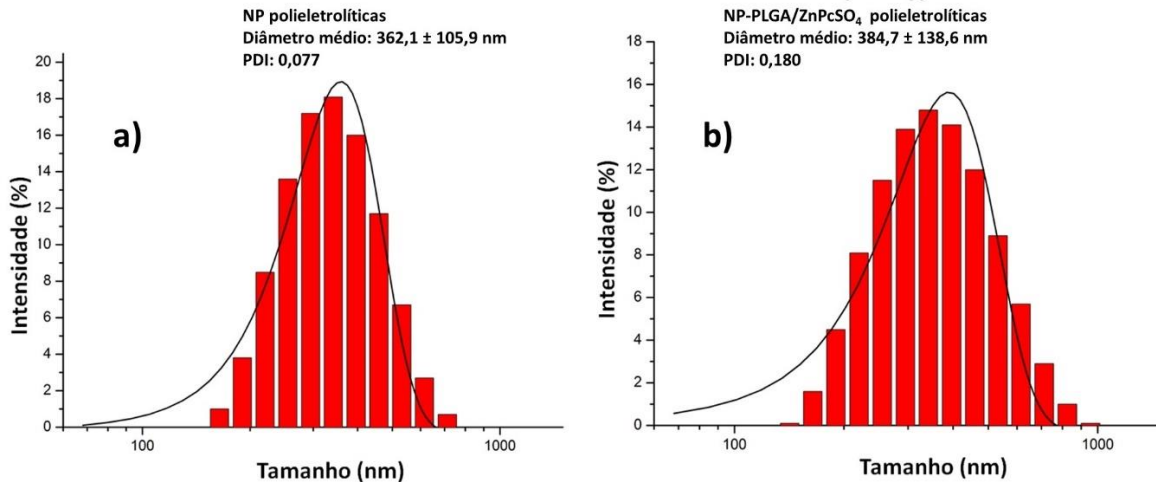


Fonte: Elaborado pela autora.

Nanopartículas têm uma vantagem adicional sobre grandes micropartículas, porque são mais adequados para entrega intravenosa. Os menores capilares do corpo têm 5–6  $\mu\text{m}$  de diâmetro. O tamanho das partículas na corrente sanguínea deve ser significativamente menor que 5  $\mu\text{m}$  para garantir que as partículas não causam embolia no organismo (SIMIONI; PRIMO; TEDESCO, 2012). Portanto, é importante medir a tamanho das partículas.

Uma curva típica de distribuição de tamanho de partícula por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) é mostrado na Figura 10a, o que implica que as dimensões das nanopartículas de PLGA não revestidas  $362,1 \pm 105,9 \text{ nm}$  (Índice de Polidispersidade (PDI) = 0,077). A Figura 10b mostra que o tamanho das nanopartículas PLGA/ZnPcSO<sub>4</sub> revestidas com as camadas polieletrólíticas apresentou diâmetro médio de  $384,7 \pm 138,6 \text{ nm}$  (PDI = 0,180).

Figura 10 - Distribuição do tamanho por medidas de PCS para as nanopartículas de: (a) PLGA não revestidas e (b) PLGA/ZnPcSO<sub>4</sub> revestidas.



Fonte: elaborado pela autora.

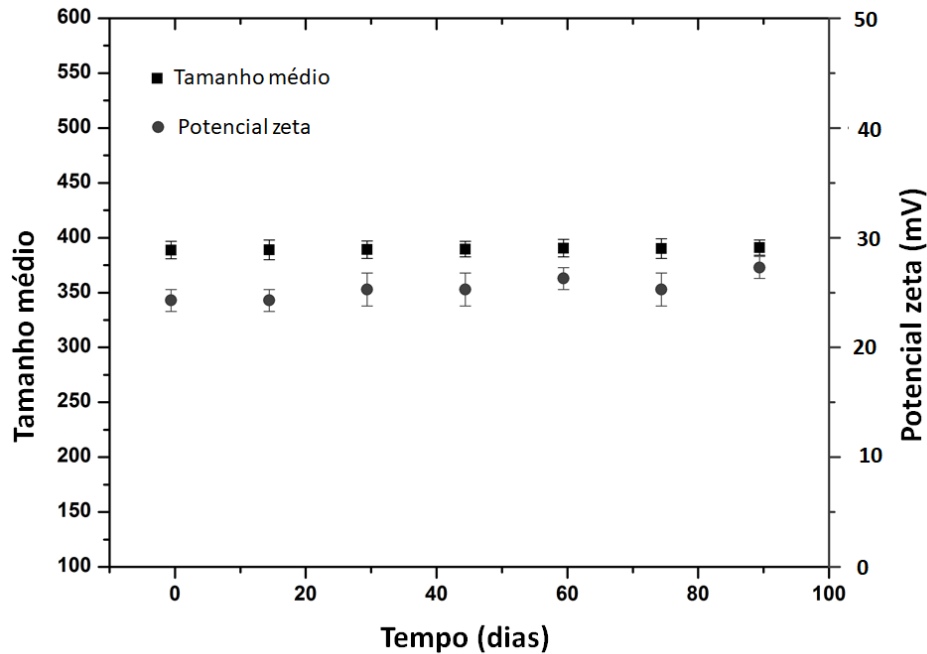
O maior diâmetro medido pelo PCS comparado com o medido pelo MEV é devido ao diferente estado das partículas durante essas medições. PCS mede o diâmetro hidrodinâmico, isto é, o tamanho de partícula incluindo a camada polieletrólítica altamente hidratada ao redor das partículas, enquanto MEV mede apenas a parte sólida das partículas (ZHOU *et al.*, 2009).

O espalhamento dinâmico de luz é usado para medir o tamanho das nanopartículas, mas também para avaliar sua estabilidade ao longo do tempo em suspensão, em diferentes condições de pH e temperatura. O potencial zeta é usado para caracterizar a carga superficial das nanopartículas,

obtendo informações sobre sua estabilidade e interação da superfície com outras moléculas (CARVALHO *et al.*, 2018).

A Figura 11 mostra a evolução temporal do tamanho e do potencial zeta para PLGA/ZnPcSO<sub>4</sub> revestidas com polieletrólitos. As amostras foram mantidas no escuro. As análises foram realizadas em função do tempo por 90 dias em água ultra-pura.

Figura 11 - Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de PLGA/ZnPcSO<sub>4</sub> revestidas com polieletrólitos monitorada durante 90 dias após a preparação.



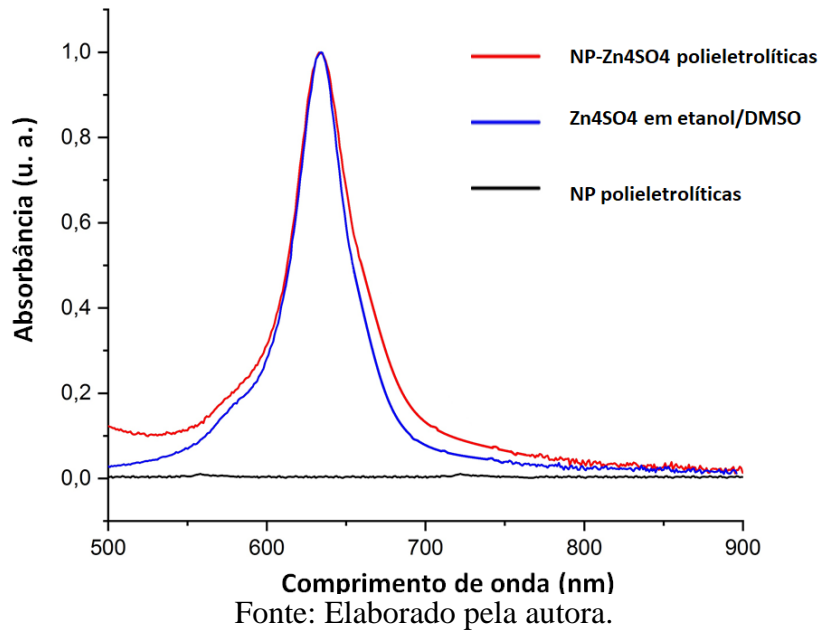
Fonte: Elaborado pela autora.

A magnitude do potencial zeta é utilizada como um indicador de estabilidade da dispersão contra agregação ou deposição (DERYABIN *et al.*, 2015). Valores de potencial zeta acima de  $\pm 30$  mV são normalmente considerados estáveis contra agregação devido à estabilização da carga, ou seja, as forças de repulsão eletrostática são altas o suficiente para impedir a agregação (LOWRY *et al.*, 2016). O potencial de superfície da partícula antes do carregamento do FS foi encontrado em -34,8 mV e após o carregamento do FS -34,5 mV. Esses dados sugerem que o fármaco está encapsulado nas nanopartículas porque o potencial zeta do sistema nanoparticulado está próximo do potencial zeta das nanopartículas “vazias” (sem o fotossensibilizador) (HONARY; ZAHIR, 2013), o que é desejável para uma nanossuspensão estável.

## 4.2 ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO NA REGIÃO DO UV-VISÍVEL

Para determinar as propriedades intrínsecas do FS sozinho e quando encapsulado em sistema nanoparticulado foi realizado o estudo de espectroscopia de absorção na região do UV-vísivel.

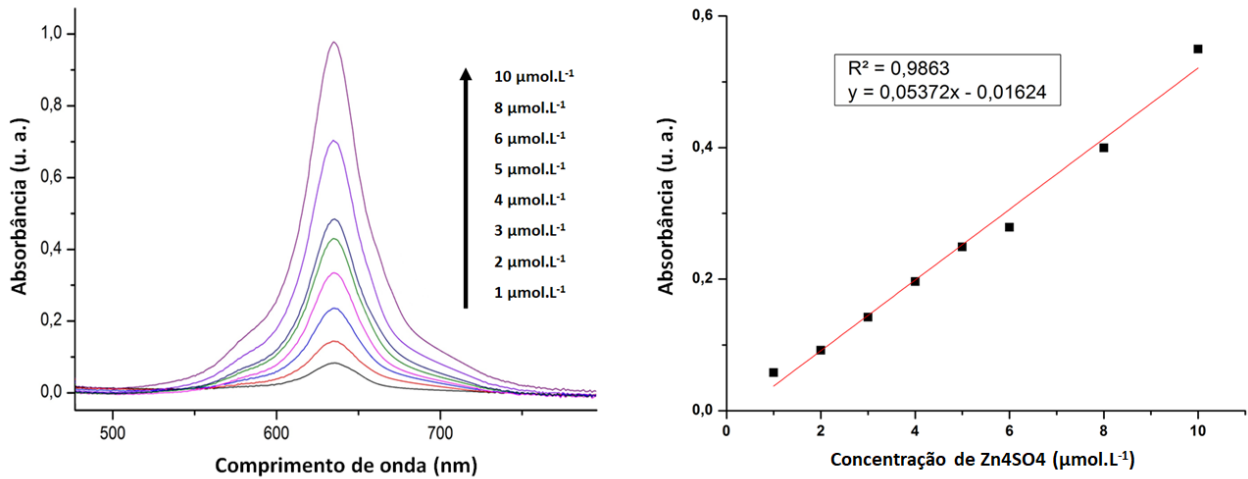
Figura 12 - Espectros de absorção da  $ZnPcSO_4$  ( $1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) em etanol/DMSO: (-)  $ZnPcSO_4$  livre; (-)  $ZnPcSO_4$  extraído de nanopartículas polieletrólítica de PLGA; (-) nanopartícula de PLGA sem o fármaco.



O espectro de absorção do fotossensibilizador, livre e encapsulado, demonstra uma forte banda de absorção em 646 nm. Essas características indicam a absorção na chamada janela terapêutica (região de 600-800 nm), sendo que é nesta região que a luz pode penetrar mais profundamente no tecido, permitindo assim um tratamento mais eficaz das lesões (MALLIDI *et al.*, 2016).

A qualidade do ajuste linear ( $R^2 \geq 0,9863$ ) indica que não ocorreu agregação em solução nas condições experimentais empregadas para esses estudos, o qual foi calculado respeitando a lei de Lambert-Beer (Figura 13).

Figura 13 - (a) Espectros de absorção de ZnPcSO<sub>4</sub> em diferentes concentrações (1,0 – 10 μmol.L<sup>-1</sup>). (b): gráfico da concentração de ZnPcSO<sub>4</sub> vs. absorbância.



Fonte: Elaborado pela autora.

A curva de calibração do fotossensibilizador se apresentou de forma linear na faixa de concentração de 1,0 - 10 μmol.L<sup>-1</sup> utilizando etanol/DMSO como solvente. A equação linear representativa foi  $\text{absorbância} = 0,05372 \times [\text{concentração ZnPcSO}_4, \mu\text{mol.L}^{-1}] - 0,01624$  ( $R^2 = 0,9863$ )

Foram obtidos rendimentos satisfatórios e eficiência de encapsulação do fotossensibilizador nas nanopartículas PLGA revestidas com filmes de polieletrólitos (rendimento =  $78\% \pm 0,9$  e EE =  $82,1\% \pm 1,2$ ). Patel *et al.* (2012) desenvolveram e caracterizaram nanopartículas multifuncionais de ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA) carregadas com indocianina verde (ICG) como um bioativo para TFD e encontraram uma eficiência de encapsulamento de  $48,75 \pm 5,48\%$  (PATEL *et al.*, 2012).

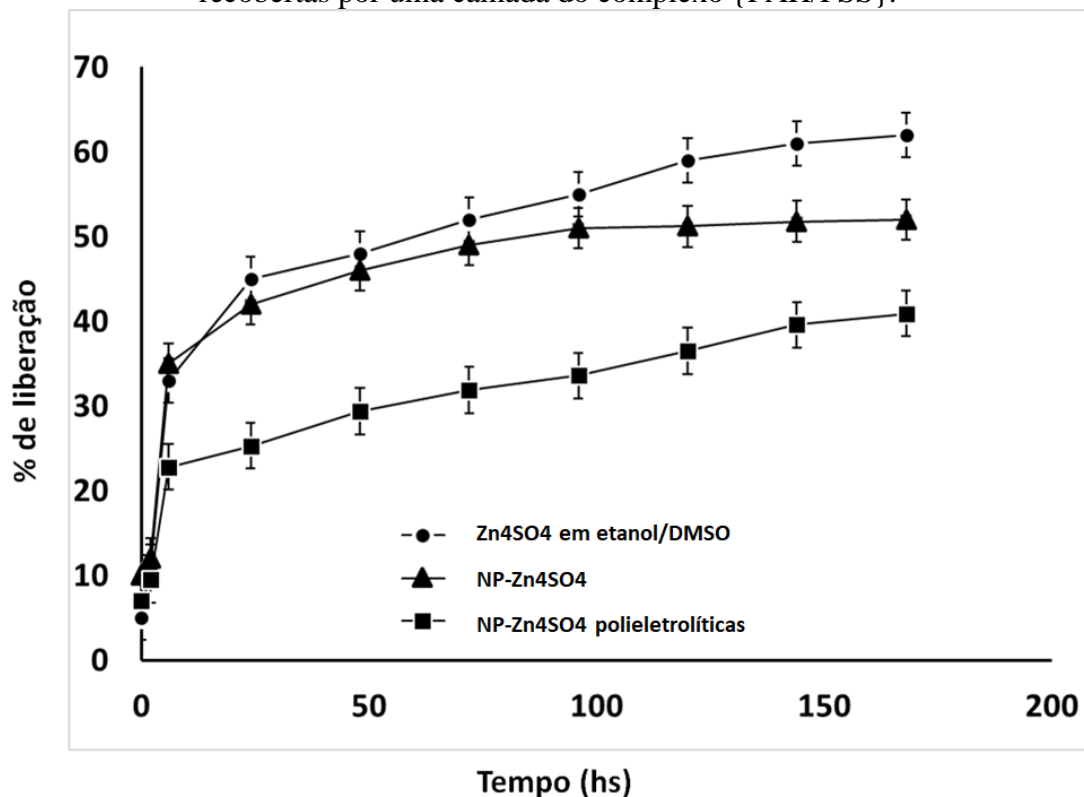
#### 4.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO DE LIBERAÇÃO DO FÁRMACO *IN VITRO*

A técnica LbL envolve a montagem alternada de filmes de polieletrólitos carregados de maneira oposta por meio de interações eletrostáticas, oferecendo múltiplas possibilidades para modificações não-covalentes de qualquer superfície para fabricação de sistemas de liberação de fármacos (ESCOBAR *et al.*, 2019). O uso dessa técnica tem demonstrado a construção de filmes finos sob condições aquosas para liberação controlada de inúmeras terapêuticas, incluindo proteínas, fatores de crescimento, peptídeos e fármacos (MOSKOWITZ *et al.*, 2010).

A estabilidade do filme polieletrólítico se deve em grande parte à interação dos polieletrólitos de cargas opostas, sendo possível a deposição de um filme estável nas nanopartículas poliméricas e que libere o fármaco de maneira gradual.

Neste estudo, a quantidade de fotossensibilizador liberado foi monitorado por espectroscopia na região do UV-vis, em 646 nm, que corresponde ao comprimento de onda de absorção máxima do fotossensibilizador em análise (Figura 14).

Figura 14 - Perfil de liberação de ZnPcSO<sub>4</sub> encapsulada em nanopartículas poliméricas de PLGA recobertas por uma camada do complexo {PAH/PSS}.



Fonte: Elaborado pela autora.

Há uma liberação inicial de ZnPcSO<sub>4</sub> nas primeiras 6 h, que libera cerca de 23% do total do fotossensibilizador liberado durante todo o experimento. Depois da liberação do *burst* inicial, ocorre uma liberação prolongada. A ZnPcSO<sub>4</sub> é liberada lentamente em um período de 6 a 100 horas, após o qual é atingido um platô. Comparativamente com o FS em sua forma livre, ou seja, quando não veiculado em um sistema de liberação, no mesmo período, a liberação inicial atinge a taxa de aproximadamente 48 %.

Ane Escobar e colaboradores (2019) demonstraram a construção de multicamadas de polieletrólitos à base de polianilina (PLL) e complexos de poli (ácido acrílico) (PAA) aplicando a técnica camada por camada (LbL) utilizando a gentamicina como antimicrobiano. Os autores relatam que a multicamada de polieletrólitos mostrou uma liberação inicial de gentamicina nas primeiras 6 h, liberando 58% do total gentamicina, seguida por uma liberação sustentável com duração de semanas (ESCOBAR *et al.*, 2019).

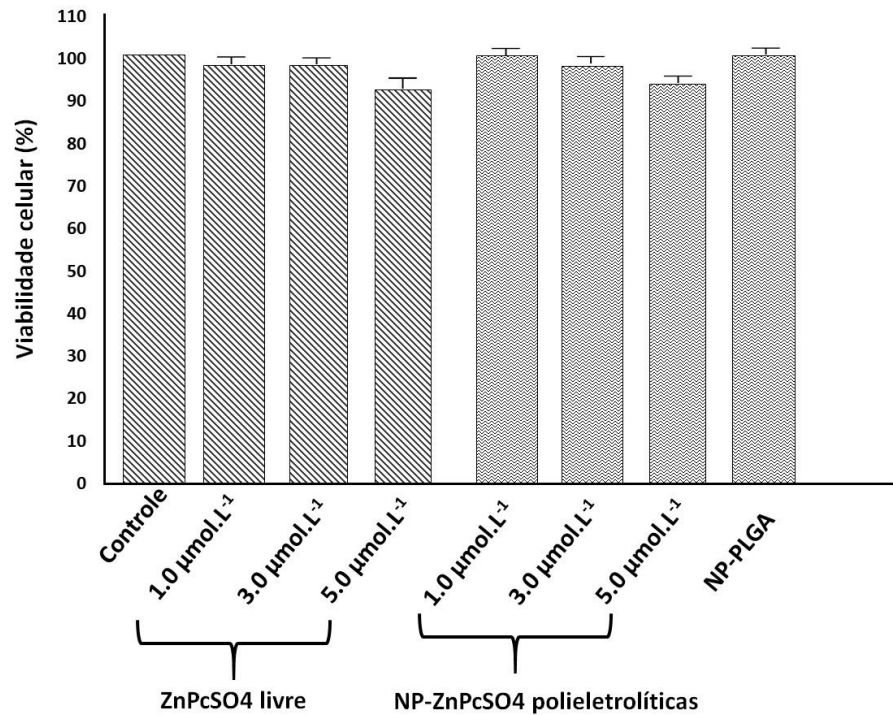
#### 4.4 ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE E FOTOTOXICIDADE *IN VITRO*

O PLGA pode ser facilmente formulado em nanopartículas para o encapsulamento de numerosos compostos, incluindo quimioterápicos, analgésicos e anti-inflamatórios (HUNG *et al.*, 2016). Neste estudo o PGLA foi utilizado para a síntese de nanopartículas polieletrólíticas encapsuladas com um fotossensibilizador ativo em TFD.

Para avaliar a biocompatibilidade e a ação fotodinâmica do sistema nanoparticulado desenvolvido foram realizados experimentos *in vitro* utilizando cultura celular em monocamada com a linhagem de camundongo murino B-16 como modelo biológico.

Nos experimentos de citotoxicidade, ou seja, na ausência de luz, a viabilidade celular foi avaliada usando a  $ZnPcSO_4$  livre e a  $ZnPcSO_4$  encapsulada, em diferentes concentrações (Figura 15).

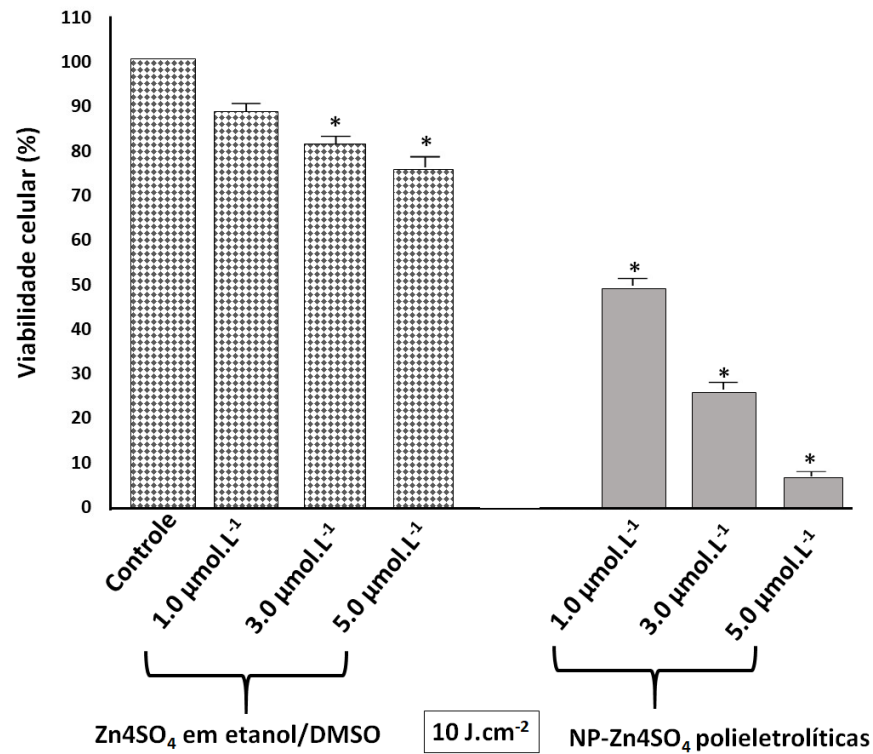
Figura 15 - Citotoxicidade do fotossensibilizador ZnPcSO<sub>4</sub> em linhagem celular B-16.



Fonte: Elaborado pela autora.

As nanopartículas vazias não foram tóxicas para o sistema celular, demonstrando a biocompatibilidade do sistema desenvolvido. Os dados da Figura 15 mostraram que as células tratadas com o fotossensibilizador livre e encapsulado em nanopartículas de PLGA polieletrólíticas não apresentaram toxicidade no escuro, com viabilidade celular acima de 90% na ausência de radiação luminosa. Entretanto, sob irradiação luminosa foi capaz de induzir efeitos prejudiciais significativos (Figura 16).

Figura 16 - Fototoxicidade do fotossensibilizador ZnPcSO<sub>4</sub> em linhagem celular B-16.



Fonte: Elaborado pela autora.

O tratamento com 5,0 μmol.L<sup>-1</sup> de ZnPcSO<sub>4</sub> encapsulada em nanopartículas poliméricas polieletrólíticas induziu 90% da morte celular contra 20% para ZnPcSO<sub>4</sub> livre sob irradiação de 10 J.cm<sup>-2</sup>. Sob a mesma irradiação, nenhuma fototoxicidade foi medida para as células de controle, mostrando a eficiência do efeito da TFD nos parâmetros analisados. Mehraban e colaboradores (2019) avaliaram o encapsulamento de um derivado da zinco ftalocianina (ZnPcBCH<sub>3</sub>) em nanopartículas poliméricas objetivando melhorar a captação celular e fototoxicidade. Os autores demonstram que a viabilidade celular foi significativamente reduzida para o ZnPcBCH<sub>3</sub> encapsulado em nanopartícula quando comparado ao controle e ZnPc-BCH<sub>3</sub> livre. Esse fator pode ser atribuído à maximização das propriedades espectroscópicas apresentadas pelo fotossensibilizador quando encapsulado em nanopartículas poliméricas, que potencializa a ação do fármaco e contribui para a ação no fotoprocesso (MEHRABAN; MUSICH; FREEMAN, 2019).

## 5 CONCLUSÃO

As nanopartículas de PLGA foram preparadas com sucesso pelo método de dupla emulsão/evaporação do solvente. Essas partículas foram recobertas com camadas de filmes de polieletrólitos pela técnica de montagem polieletrólítica LbL utilizando dois polieletrólitos de carga oposta (PAH/PSS), e o sistema nanoparticulado foi carregado com a zinco ftalocianina tetrassulfonada ( $ZnPcSO_4$ ) para produzir nanopartículas de PLGA fotossensível funcionalizadas; A nanoencapsulação foi adequado para a preparação de NP-PLGA porque o sistema se apresentou em tamanho nanométrico, com distribuição homogênea e formato regular. O recobrimento das nanopartículas com filme fino de polieletrólitos de cargas opostas pela técnica da LbL reduziu a taxa de liberação e atenuou o *burst* inicial do FS. A toxicidade no escuro, realizada por experimentos *in vitro* utilizando células B-16 como modelo biológico, mostrou a biocompatibilidade do sistema nanoparticulado desenvolvido neste trabalho e a fototoxicidade 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. Esses resultados reforçam a ideia de que o uso de sistemas de liberação de fármacos, como as nanopartículas polieletrólíticas de PLGA, é promissor para TFD em tecidos neoplásicos.

## REFERÊNCIAS

ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 4, p. 347–364, 2016. DOI 10.1042/BJ20150942..

ANANDHAKUMAR, S.; GOKUL, P.; RAICHUR, A. M. Stimuli-responsive weak polyelectrolyte multilayer films: A thin film platform for self triggered multi-drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v.58, p.622-628, 2016.

BASSIR, S. H. *et al.* Photoactivated disinfection using light-emitting diode as an adjunct in the management of chronic periodontitis: A pilot double-blind split-mouth randomized clinical trial. **Journal of Clinical Periodontology**, v.40, n.1, p.65-72, 2013.

BLOISE, N. *et al.* Can Nanotechnology Shine a New Light on Antimicrobial Photodynamic Therapies? In: TANAKA, Yohei (ed.). **Photomedicine: Advances in Clinical Practice**. London: IntechOpen, 2017. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/photomedicine-advances-in-clinical-practice/can-nanotechnology-shine-a-new-light-on-antimicrobial-photodynamic-therapies->

BONNETT, R.. Photosensitizers of the porphyrin and phthalocyanine series for photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v.24, n.1, p.19-33, 1995.

BOSQUILLON, C. *et al.* Influence of formulation excipients and physical characteristics of inhalation dry powders on their aerosolization performance. **Journal of Controlled Release**, v.70, n.3, p.329-339 2001.

BRADEN, A. *et al.* Polymeric nanoparticles for sustained down-regulation of annexin A2 lead to reduction in proliferation and migration of prostate cancer cells. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v.3, n.2, p.148-159, 2007.

CALZONI, E. *et al.* Biocompatible polymer nanoparticles for drug delivery applications in cancer and neurodegenerative disorder therapies. *Journal of Functional Biomaterials*, v. 10, n.1, p.4, 2019. DOI [10.3390/jfb10010004](https://doi.org/10.3390/jfb10010004)

CAMPOS, I. **Preparo e caracterização de nanopartículas de PLGA para liberação de acetato de dexametasona**. 2013. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CAMPOS, P. P.; FRACETO, L. F.; FERREIRA, M. Layer-by-layer films containing emodin or emodin encapsulated in liposomes for transdermal applications. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v.162, p.69-75, 2018.

CANCINO, J.; MARANGONI, V. S.; ZUCOLOTTO, V. Nanotecnologia em medicina: Aspectos

fundamentais e principais preocupações. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 521-526, 2014.

CARVALHO, P. M. *et al.* Application of light scattering techniques to nanoparticle characterization and development. **Frontiers in Chemistry**, v.6, 2018. Doi: 10.3389/fchem.2018.00237

CHAI, F. *et al.* Doxorubicin-loaded poly (Lactic-co-glycolic acid) nanoparticles coated with chitosan/alginate by layer by layer technology for antitumor applications. **International Journal of Nanomedicine**, v.12, p.1791, 2017.

COSTA, R. R.; ALATORRE-MEDA, M.; MANO, J. F. Drug nano-reservoirs synthesized using layer-by-layer technologies. **Biotechnology Advances**, v.33, n.6, p.1310-1326, 2015.

CRUCHO, C. I.C.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering C.**, v.80, p.771-784, 2017.

DA HORA MACHADO, A. E. Terapia Fotodinâmica: Princípios, Potencial de Aplicação e Perspectivas. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, abr. 2000. doi.org/10.1590/S0100-40422000000200015

DE OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos fundamentais e aplicações de fotossensibilizadores do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas em terapias fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v.7, n.1, p.310-335, 2015.

DECHER, G.; HONG, J. D.; SCHMITT, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process: III. Consecutively alternating adsorption of anionic and cationic polyelectrolytes on charged surfaces. **Thin Solid Films**, v. 210–211, p. 831-835, Apr. 1992. Doi: 10.1016/0040-6090(92)90417-A.

DECHER, G. Fuzzy nanoassemblies: Toward layered polymeric multicomposites. **Science**, v.277, n.5330, p.1232-1237, 1997.

DELGADO, J. **Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa**. 2013. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Biomédica) Instituto Politécnico de Bragança, Bragança, Portugal, 2013.

DERYABIN, D. G. *et al.* A zeta potential value determines the aggregate's size of penta-substituted [60] fullerene derivatives in aqueous suspension whereas positive charge is required for toxicity against bacterial cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, p. 50, 2015. DOI 10.1186/s12951-015-0112-6

DINARVAND, R. *et al.* Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents. **International journal of nanomedicine**, v.6, p.877-895, 2011.

DING, Y. F. *et al.* Highly Biocompatible Chlorin e6-Loaded Chitosan Nanoparticles for

Improved Photodynamic Cancer Therapy. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v.10, n.12, pp.9980-9987, 2018.

DOS SANTOS, S. N. *et al.* Anti-inflammatory/infection PLA nanoparticles labeled with technetium 99m for in vivo imaging. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, p. 345, 2017. Doi: 10.1007/s11051-017-4037-x

ECHEVARRÍA-CASTILLO, F. Retos de este siglo: Nanotecnología y salud. **Revista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia**, v.29, n.1, p.3-15, 2013.

ESCOBAR, A. *et al.* Antibacterial Layer-by-Layer Films of Poly(acrylic acid)–Gentamicin Complexes with a Combined Burst and Sustainable Release of Gentamicin. **Advanced Materials Interfaces**, v. 6, n. 22 , 2019. [10.1002/admi.201901373](https://doi.org/10.1002/admi.201901373)

GOLAN, D. E.; TASHJIAN, A. H.; ARMSTRONG, A. W. **Princípios de Farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

HEHENBERGER, M. **Nanomedicine: science, business, and impact**. 1. ed.: New York: Jenny Stanford Publishing, 2015.

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

HSU, B. B.; HAGERMAN, S. R.; HAMMOND, P. T. Rapid and efficient sprayed multilayer films for controlled drug delivery. **Journal of Applied Polymer Science**, v.133, n.25, 2016. Doi: 10.1002/app.43563

HUANG, Y. *et al.* Zinc phthalocyanine tetrasulfonate (ZnPcS4): A new photosensitizer for photodynamic therapy in choroidal neovascularization. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, V.23, n.4, p.377-386, 2007. Doi: 10.1089/jop.2006.0135.

HUNG, H. I. *et al.* PLGA nanoparticle encapsulation reduces toxicity while retaining the therapeutic efficacy of EtNBS-PDT in vitro. **Scientific Reports**, v.6, n. 33234, 2016. DOI: 10.1038/srep33234

IRFAN, A. M. **This is nanotechnology - one of the fastest growing markets in the world**. 2013. Disponível em: <<http://www.gaeu.com/item/this-is-nanotechnology-one-of-the-fastest-growing-markets-in-theworld>>. Acesso em: 17 jun. 2018.

JAWAID, M.; SWAIN, S. K. **Bionanocomposites for packaging applications**, Cham, Switzerland:Springer, 2017.

KAHLWEIT, M. *et al.* How to study microemulsions. **Journal of Colloid And Interface Science**, v.118, n. 2, p.436-453, 1987. Doi: [10.1016/0021-9797\(87\)90480-2](https://doi.org/10.1016/0021-9797(87)90480-2)

KAWCZYK-KRUPKA, A. *et al.* Photodynamic therapy as an alternative to antibiotic therapy for the treatment of infected leg ulcers. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.23, p.132-143 2018.

KOLÁROVÁ, H. *et al.* In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. **Toxicology in Vitro**, v.17, n. 5–6, p.775-778, Oct./Dec. 2003. Doi: 10.1016/S0887-2333(03)00094-8

KOLLURU, L. P. *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.

LI, Q. *et al.* A review of the structure, preparation, and application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v.7, n.6, p. 122, 2017.

LI, S. *et al.* Biodegradable polymersomes with an ionizable membrane: Facile preparation, superior protein loading, and endosomal pH-responsive protein release. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 82, n.1, p. 103-111, 2012.

LI, X. *et al.* New application of phthalocyanine molecules: From photodynamic therapy to photothermal therapy by means of structural regulation rather than formation of aggregates. **Chemical Science**, v. 9, n. 8, p. 2098-2104, 2018.

LIU, W. *et al.* Intravenous repeated-dose toxicity study of ZnPcS2P2-based-photodynamic therapy in beagle dogs. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.47, n.3, pp.221-231, 2007.

LOWRY, G. V. *et al.* Guidance to improve the scientific value of zeta-potential measurements in nanoEHS. **Environmental Science: Nano**, v.3, n. 5, p.953-965, 2016.

SCHERER, K. M. *et al.* New Approaches to Photodynamic Therapy from Types I, II and III to Type IV Using One or More Photons. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v.17, n.2, p.171-189, 2016.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. J. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.5, n. 2, p. 105-129, 2001..

MAKADIA, H. K.; SIEGEL, S. J. Poly Lactic-co-Glycolic Acid (PLGA) as biodegradable controlled drug delivery carrier. **Polymers**, v. 3, n. 3, p.1377-1397, 2011.

MALLIDI, S. *et al.* Beyond the barriers of light penetration: Strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. **Theranostics**, v.6, n. 13, p. 2458–2487, 2016.

MEHRABAN, N.; MUSICH, P. R.; FREEMAN, H. S. Synthesis and encapsulation of a new zinc phthalocyanine photosensitizer into polymeric nanoparticles to enhance cell uptake and phototoxicity. **Applied Sciences** (Switzerland), v. 9, n. 3, p. 401, 2019.

- MESQUITA, M. Q. *et al.* An insight on the role of photosensitizer nanocarriers for photodynamic therapy. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.90, n.1, suppl. 2, p.1101-1130 2018.
- MODESTO, M.C. *et al.* Padronização da metodologia utilizando terapia fotodinâmica sobre cepa de *Candida albicans* isolada de cateter. In: ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 18; ENCONTRO LATINO AMERICANO DE PÓS-GRADUAÇÃO, 14 e ENCONTRO DE INICIAÇÃO À DOCÊNCIA, 4. São José dos Campos, 2014. **Anais...**, São José dos Campos: Universidade do Vale do Paraíba, 2014.
- MOHANTY, C. *et al.* Receptor Mediated Tumor Targeting: An Emerging Approach for Cancer Therapy. **Current Drug Delivery**, v. 8, n. 1, p. 45-58, 2011. Doi: 10.2174/156720111793663606.
- MONTES, R. H.O. *et al.* Carbon-nanotube amperometric sensor for selective determination of 4-chloroaniline in commercial chlorhexidine solutions. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v.231, p.38-44, 2016.
- MOSKOWITZ, J. S. *et al.* The effectiveness of the controlled release of gentamicin from polyelectrolyte multilayers in the treatment of *Staphylococcus aureus* infection in a rabbit bone model. **Biomaterials**, v. 31, n. 23, p. 6019-6030, Aug. 2010.
- PATEL, R. H. *et al.* Multifunctionality of indocyanine green-loaded biodegradable nanoparticles for enhanced optical imaging and hyperthermia intervention of cancer. **Journal of Biomedical Optics**, v. 17, n.4, p. 046003, 2012. Doi: 10.1117/1.JBO.17.4.046003.
- PATERNIO, L. G.; MATTOSO, L. H. C.; DE OLIVEIRA, O. N. Filmes poliméricos ultrafinos produzidos pela técnica de automontagem: Preparação, propriedades e aplicações. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 228-235, 2001.
- PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007. DOI 10.1590/S0100-40422007000400039.
- SAH, E.; SAH, H. Recent trends in preparation of poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles by mixing polymeric organic solution with antisolvent. **Journal of Nanomaterials**, v. 2015, 2015. DOI: [10.1155/2015/794601](https://doi.org/10.1155/2015/794601)
- SALIS, G. *et al.* Desenvolvimento e caracterização de microemulsões, carreadoras de zinco ftalocianina tetrassulfonada ( $ZnPCSO_4$ ), utilizadas na terapia fotodinâmica do câncer de córtex cerebral. **Ciência, Pesquisa e Consciência Revista de Medicina**, v. 7, p. 7–11, 2015.
- SIBATA, C. H. *et al.* Photodynamic therapy: A new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, ago. 2000. Doi. 10.1590/S0100-879X2000000800002.
- SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. Silicon(IV) phthalocyanine-loaded-nanoparticles for application in photodynamic process. **Journal of Laser Applications**, v.24, n.

1, 2012. Doi: 10.2351/1.3669442

SOHIER, J. *et al.* Release of small water-soluble drugs from multiblock copolymer microspheres: A feasibility study. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v.55, n.2, p.221-228, 2003.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of Controlled Release**, v.70, n.1, p.1-20, 2001.

SOUZA, E. **Efeito da terapia fotodinâmica na desinfecção do sistema de canais radiculares in vivo**. 2011. Tese (Doutorado em Endodontia) - Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011. doi:10.11606/T.23.2011.tde-04102011-120412.

TAN, H. L. *et al.* Temperature Dependence of Polyelectrolyte Multilayer Assembly. **Langmuir**, v.19, n.22, p.9311-9314, 2003.

UEJO, F. *et al.* Dissolution improvement of fenofibrate by melting inclusion in mesoporous silica. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.8, n.6, p.329-335, 2013.

WACKER, M. Nanocarriers for intravenous injection - The long hard road to the market. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 457, n.1, p.50-62, 2013.

WANG, B. *et al.* Direct Loading and Tunable Release of Antibiotics from Polyelectrolyte Multilayers to Reduce Bacterial Adhesion and Biofilm Formation. **Bioconjugate Chemistry**, v.27, n.5, p.1305, 2016.

YIN, R. *et al.* Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: Small light strides against bad bugs. **Nanomedicine**, v.10, n. 15, p.2379-2404, 2015.

ZARNEGAR, Z.; SAFARI, J. Magnetic nanoparticles supported imidazolium-based ionic liquids as nanocatalyst in microwave-mediated solvent-free Biginelli reaction. **Journal of Nanoparticle Research**, v.16, p. 2509, 2014. Doi: 10.1007/s11051-014-2509-9

ZHAO, X. *et al.* Hydrophobic dye/polymer composite colorants synthesized by miniemulsion solvent evaporation technique. **Dyes and Pigments**, v.100, p.41-49, 2014.

ZHOU, J *et al.* Polyelectrolyte coated PLGA nanoparticles: Templatation and release behavior. **Macromolecular Bioscience**, v.9, n.4, p.326-335, 2009.