

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

Mariana Ribeiro Farah Mazzilli

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULA
POLIELETROLÍTICA DE BSA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA
COMPOSTOS ATIVOS EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

São José dos Campos

2020

Mariana Ribeiro Farah Mazzilli

**PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULA
POLIELETROLÍTICA DE BSA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA
COMPOSTOS ATIVOS EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

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

Área de concentração: Engenharias IV

Orientador: Prof^a Dr^a Andreza Ribeiro Simioni

São José dos Campos
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Mazzilli, Mariana Ribeiro Farah

PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULA POLIELETROLÍTICA DE BSA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA COMPOSTOS ATIVOS EM TERAPIA FOTODINÂMICA / Mariana Ribeiro Farah Mazzilli; orientador, Andreza Ribeiro Simioni. - São José dos Campos, SP, 2020.

54 p.

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

Inclui referências

1. Bioengenharia. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Fotossensibilizador. 4. Ftalocianina de silício di-hidróxido. 5. Albumina sérica bovina. I. Ribeiro Simioni, Andreza, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Bioengenharia. III. Título.

Eu, Mariana Ribeiro Farah Mazzilli, 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, 28 de Abril de 2020.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 30 / 05 / 2020

MARIANA RIBEIRO FARAH MAZZILLI

“PREPARAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE NANOPARTÍCULA POLIELETROLÍTICA DE BSA COMO SISTEMA DE LIBERAÇÃO PARA COMPOSTOS ATIVOS 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.^a DR.^a ERIKA PETERSON GONÇALVES



PROF.^a DR.^a ANDREZA RIBEIRO SIMIONI



PROF.^a DR.^a SÔNIA KHOURI SIBELINO



PROF.^a DR.^a ANDREA SANTOS LIU - IFSP



Prof.^a Dr.^a Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 30 de abril de 2020.

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, meu guia, por ter me dado saúde e força para enfrentar todas as dificuldades que apareceram. Agradeço por ter me iluminado a fazer sempre o certo e por ter me dado a oportunidade de viver tudo isso e não somente nestes anos no mestrado, mas que em todos os momentos

Agradeço aos meus pais, Ronaldo e Cláudia, que me ensinaram a ser o que eu sou hoje, me mostraram o que é o amor, me incentivaram sempre, me apoiaram incondicionalmente. Agradeço a minha mãe, minha melhor amiga, que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, que não me deixou desistir na minha primeira dificuldade, que entendeu todos os meus momentos de estresse, que ficou do meu lado sempre, agradeço simplesmente por ser minha mãe. Agradeço ao meu pai, meu herói, a pessoa em quem eu me espelho sempre, que apesar de todas as dificuldades me fortaleceu, pai sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada.

À minha irmã Marília, que foi a minha maior incentivadora a começar este mestrado, que entendeu os meus momentos de estresse, por ter paciência e ter me ajudado em tudo que eu precisei.

Ao meu namorado, meu companheiro, por ter me apoiado, por ter me aguentado em meus momentos de desespero, que tentou compreender a minha situação e ficou do meu lado sempre.

À minha amiga Deise Trevisan, mostrou ser uma amiga incrível, que me ouviu, me apoiou, chorou comigo, viveu os meus melhores e piores momentos.

À minha orientadora Prof^a Dr^a Andreza, pela disposição, aprendizado e orientação em me auxiliar no desenvolvimento desta dissertação.

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

RESUMO

Este trabalho descreve a síntese e caracterização de nanopartículas polieletrólíticas de albumina sérica bovina (BSA) para liberação controlada utilizando a ftalocianina de silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂] como modelo de fotossensibilizador para aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD). As nanopartículas de BSA foram preparadas pelo processo de dessolvatação em um passo e o sistema nanoparticulado foi recoberto com polieletrólitos utilizando o poli-(4-estireno sulfonato de sódio) como um poliânion forte e o hidrocloreto de poli-alilamina como um policátion fraco pela técnica de automontagem camada por camada (conhecida como *layer-by-layer-LbL*). O sistema nanoparticulado funcionalizado com a camada de biofilme polieletrólítico apresentou um diâmetro hidrodinâmico médio de volume de $226,9 \pm 88,74$ nm com índice de polidispersividade de 0,153. A mudança do potencial zeta indica alternância bem-sucedida na deposição do policátion PAH e do poliânion diretamente nas nanopartículas de BSA. A investigação de liberação de drogas *in vitro* constatou que a bicamada de polieletrólito depositada via LbL é muito eficiente na redução da taxa de liberação inicial (*burst* inicial) para os medicamentos carregados nas nanopartículas de BSA. A atividade fotobiológica para o sistema nanoparticulado foi avaliada em linhagem celular de melanoma murinho de camundongo (B-16). Os estudos *in vitro* mostraram que o sistema não é citotóxico no escuro, mas exibe uma fototoxicidade substancial quando combinados na proporção de $1,2 \text{ mol.L}^{-1}$ de fotossensibilizador encapsulado e $10,0 \text{ J.cm}^{-2}$ de luz. Estas condições são suficientes para matar cerca de 90% das células. Os resultados demonstram que a adsorção do fotossensibilizador nas nanopartículas de BSA juntamente com a montagem camada a camada de polieletrólitos fornece uma forma de fabricação de materiais nanoestruturados biocompatíveis, que visam a sua utilização como biomaterial para aplicação em Terapia Fotodinâmica e visando contribuir para o aprimoramento tecnológico e científico do país em área inovadora e com potencial elevado de impacto social.

Palavras-chave: Albumina sérica bovina. Dessolvatação. Fotossensibilizador. Nanopartículas. Polieletrólitos. Terapia fotodinâmica.

PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOPARTICLE BSA POLYELECTROLYTICS AS A RELEASE SYSTEM FOR ACTIVE COMPOUNDS IN PHOTODYNAMIC THERAPY

ABSTRACT

This work describes the synthesis and characterization of bovine serum albumin (BSA) polyelectrolytic nanoparticles for controlled release using silicon dihydroxide phthalocyanine [SiPc (OH)₂] as a photosensitizer model for application in Photodynamic Therapy (TFD). BSA nanoparticles were prepared by the one-step desolvation process and the nanoparticulate system was coated with polyelectrolytes using poly-(4-estireno sulfonato de sódio) as a strong polyanion and polyallylamine hydrochloride as a weak polycation by the technique layer by layer (known as layer-by-layer-LbL). The nanoparticulate system functionalized with the polyelectrolytic biofilm layer presented an average hydrodynamic volume diameter of 226.9 ± 88.74 nm with a polydispersity index of 0.153. The change in zeta potential indicates successful alternation in PAH and polyanion deposition directly into BSA nanoparticles. In vitro drug release investigation has found that LbL-deposited polyelectrolyte bilayer is very effective in reducing the initial burst rate for drugs loaded on BSA nanoparticles. Photobiological activity for the nanoparticulate system was evaluated in mouse murine melanoma cell line (B-16). In vitro studies have shown that the system is not cytotoxic in the dark, but exhibits substantial phototoxicity when combined at a ratio of 1.2 mol.L^{-1} encapsulated photosensitizer and 10.0 J.cm^{-2} light. These conditions are sufficient to kill about 90% of cells. The results demonstrate that the photosensitizer adsorption on BSA nanoparticles together with the polyelectrolyte layer-by-layer assembly provides a way to manufacture biocompatible, nanostructured materials that are intended for use as biomaterials for Photodynamic Therapy applications and to contribute to the technological improvement and of the country in an innovative area with a high potential for social impact.

Keywords: Bovine serum albumin. Desolvation. Photosensitizer. Nanoparticles. Polyelectrolytes. Photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Elementos em uma escala nanométrica.	10
Figura 2: Esquema geral da TFD, onde FS= fotossensibilizador, EROs = espécies reativas de oxigênio.	14
Figura 3: Protocolo de aplicação clínica da TFD.	15
Figura 4: Mecanismos da TFD (Diagrama de Jablonski simplificado).....	16
Figura 5: Classificação dos fotossensibilizadores.	18
Figura 6: (A): Estrutura molecular base das ftalocianinas; (B): Estrutura molecular da silício di-hidróxido [SiPc(OH) ₂].....	20
Figura 7: Concentração de droga no sítio terapêutico de ação após sua liberação através de (a) sistema de liberação controlada e (b) sistemas convencionais.	22
Figura 8: Representação esquemática de uma nanoesfera ou nanocápsula.	23
Figura 9: Preparação das nanopartículas polieletrólíticas de BSA.....	28
Figura 10: Esquema de preparação das nanopartículas polieletrólíticas de BSA fotossensíveis.	29
Figura 11: Deposição da camada LbL.....	35
Figura 12: Microscopia eletrônica de varredura: (a) nanopartículas polieletrólíticas de BSA; (b) nanopartículas polieletrólíticas de BSA com fotossensibilizador.....	36
Figura 13: Distribuição de tamanho medido por PCS medido para o sistema nanoparticulado: (a) nanopartículas de BSA com o FS; (b) nanopartículas polieletrólíticas de BSA com fotossensibilizador e uma camada de PAH; (c) nanopartículas polieletrólíticas de BSA com fotossensibilizador, uma camada de PAH e PSS.....	37
Figura 14: Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de nanopartículas polieletrólíticas de BSA- SiPc(OH) ₂ monitorada durante 90 dias após a preparação.....	38
Figura 15: (a): Espectros de absorção de SiPc(OH) ₂ em diferentes concentrações (0,5 - 1,3 μmol.L ⁻¹). (b): gráfico da concentração de SiPc(OH) ₂ vs. absorbância.	39
Figura 16: Espectros de absorção da SiPc(OH) ₂ (1 μmol.L ⁻¹) em etanol:(--) padrão SiPc(OH) ₂ e (-) SiPc(OH) ₂ extraído de nanopartículas polieletrólítica de BSA.....	40
Figura 17: Perfil de liberação da SiPc(OH) ₂	42
Figura 18: Citotoxicidade de SiPc(OH) ₂ em células B-16. As células foram incubadas variando as concentrações de NPBSA- SiPc(OH) ₂ (0,50; 0,90 e 1,2 μmol.L ⁻¹) e do FS em etanol por 3 h no escuro. Os dados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes; * p <0,05.	43
Figura 19: Fototoxicidade de SiPc(OH) ₂ em células B-16.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

[SiPc(OH)₂] - Ftalocianina de silício di-hidróxido

ANOVA – Análise de variância unidirecional

BSA – Albumina sérica bovina

DDS – Drug delivery systems

DI- Água deionizada

DLS – Espalhamento dinâmico de luz

EE – Eficiência de encapsulamento

EROS – Espécies reativas de oxigênio

FS – Fotossensibilizador

HpD – Hematoporfirina

HSA – Albumina sérica humana

LbL – Layer-by-layer

MEV – Microscopia eletrônica de varredura

NPs – Nanopartículas

PAH – Poli (alilamina hidrocloreada)

PSS – Poli (estireno sulfonato de sódio)

S₁ – Singleto excitado

S₀ – Estado fundamental

T₁ – Tripleto excitado

TFD – Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

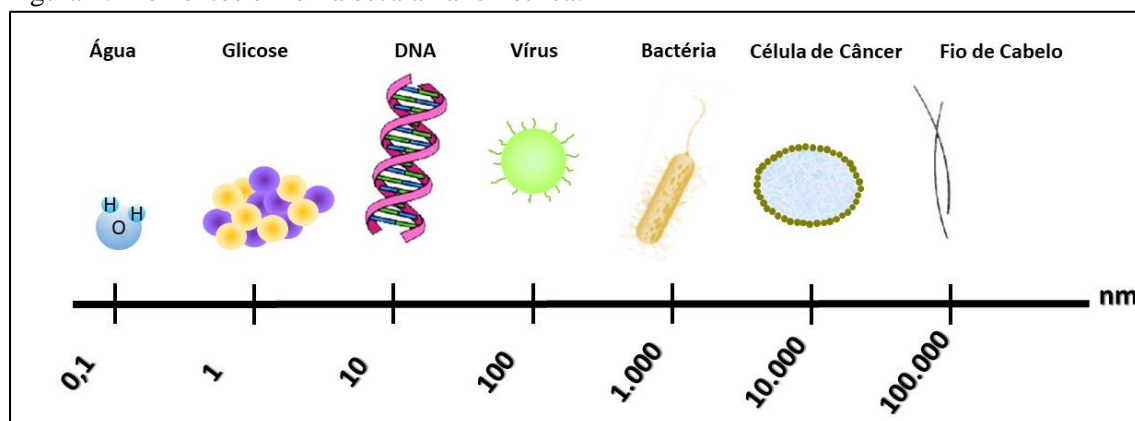
1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	13
2.1 Objetivos Gerais	13
2.2 Objetivos Específicos	13
3 REVISÃO DA LITERATURA	14
3.1 Terapia Fotodinâmica	14
3.2 Fotossensibilizadores	16
3.3 Ftalocianinas	19
3.4 Sistema de Liberação	21
3.5 Nanopartículas de BSA	24
3.6 Layer-By-Layer	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1 Materiais.....	27
4.2 Preparação do BSA	27
4.3 Caracterização Morfológica	29
4.4 Caracterização Físico-Química de Nanopartículas de NPBSA- SIPc(OH) ₂	29
4.5 Espectroscopia de Absorção Uv-Vis no Estado Estacionário.....	29
4.6 Rendimento do Processo (%).....	30
4.7 Determinação da Eficiência de Encapsulamento (EE).....	30
4.8 Avaliação do Desempenho de Liberação do Fármaco <i>In Vitro</i>	31
4.9.A Culturas de Células	31
4.9.B Ensaio de Citotoxicidade das NPBSA- SIPc(OH) ₂	31
4.9.C Ensaio de Fotocitotoxicidade das NPBSA- SIPc(OH) ₂ em Células de Melanoma de Camundongo	32
4.10 Ensaio de Viabilidade por MTT.....	32
4.11 Análise Estatística.....	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1 Fabricação do Sistema Nanoparticulado.....	34
5.2 Caracterização Morfológica	35
5.3 Caracterização Físico-Química de Nanopartículas de Npbsa- Sipc(OH) ₂	36
5.4 Espectroscopia de Absorção Uv-Vis No Estado Estacionário	38
5.5 Avaliação do Desempenho de Liberação do Fármaco <i>In Vitro</i>	41
5.6 Ensaio de Citotoxicidade de Npbsa- Sipc(OH) ₂	42
5.7 Ensaio de Fototoxicidade de Npbsa- Sipc(OH) ₂	44
6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS	47

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, diversos avanços científicos-tecnológicos englobando a área da saúde têm se desenvolvido. Entre eles, podemos destacar as pesquisas abordando à nanociência e nanotecnologia com foco no desenvolvimento de formulações para o tratamento de câncer, fungos e bactérias.

A nanotecnologia permite a criação de materiais funcionais por meio do controle da matéria na escala nanométrica (igual ou inferior a um bilionésimo de metro), criando produtos com propriedades químicas, físicas e mecânicas diferentes dos materiais de origem (escala macroscópica). Para exemplificar a escala de comprimento, um fio de cabelo humano tem 100.000 nm de largura e uma célula de câncer tem aproximadamente 10.000 nm de largura (Figura 1) (MOHANTY; SENAPATI, 2017).

Figura 1: Elementos em uma escala nanométrica.



Fonte: o autor.

Com a evolução e variedades de estruturas produzidas, a veiculação de princípios ativos (fármacos) em nanodispositivos vêm sendo desenvolvida por pesquisadores do mundo todo com o propósito de direcionar e controlar a liberação de fármacos, descritos na literatura como sistemas de liberação controlada (*drug delivery systems- DDS*), visando controlar a velocidade e o local de liberação dos fármacos no organismo. A nanotecnologia aplicada à saúde, também chamada de nanobiotecnologia, visa o desenvolvimento de nanosistemas, como lipossomas, nanoemulsões e nanopartículas, que possibilitam o controle da biodistribuição e a liberação de um fármaco de maneira sítio-específica (THASSU; PATHAK; DELEERS, 2007).

A Terapia Fotodinâmica (TFD) e o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados como veículos para a liberação de agentes ativos nesta terapia destaca-se como um processo promissor visando o tratamento seletivo de tecidos neoplásicos.

A TFD se configura como uma técnica de tratamento bem estabelecida para doenças oncológicas e não-oncológicas como fungicas, bacterianas e virais. O protocolo de aplicação da TFD se baseia na ativação de um fotossensibilizador (FS) com luz na região do vermelho no espectro eletromagnético, que na presença de oxigênio molecular, produz espécies reativas de oxigênio que resulta no dano celular das células que foram expostas ao FS e a luz simultaneamente, configurando a seletividade do processo.

As ftalocianinas são classificadas como fotossensibilizadores de segunda geração e apresentam elevada conjugação eletrônica, o que permite a absorção de luz na região do visível com bandas na região de 600 nm – 750 nm, faixa conhecida como janela terapêutica, onde a penetração de luz no tecido é maximizada. Dentre as ftalocianinas, podemos destacar a ftalocianina de silício (SiPc) que se mostrou um promissor fotossensibilizador em testes usando células de tumor *in vitro*. Porém, as ftalocianinas de silício substituídas, dentre elas a ftalocianina de silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂], não tem recebido muita atenção quanto as suas propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotobiológicas.

Nanopartículas de macromoléculas biológicas como a soro albumina bovina (BSA) podem atuar como DDS eficientes para liberação controlada e direcionada, visando melhorar os efeitos terapêuticos e reduzir os efeitos colaterais dos fármacos formulados.

Na maior parte do padrão de liberação da droga, a liberação bifásica é mais comum e inclui dois estágios: uma fase inicial de liberação imediata das drogas associadas na superfície das nanopartículas (aquelas que interagem fracamente) e, em seguida, uma segunda fase, onde os ligantes covalentemente ligados são liberados em lenta difusão da matriz, exibindo liberação prolongada e sustentada (YASMIN *et al*, 2017). Uma possibilidade para reduzir a taxa de liberação e suprimir a rápida liberação inicial é para encapsular a droga carregada em nanopartículas com filmes poliméricos finos (WANG *et al*, 2008).

A montagem de camada por camada, conhecida como *layer-by-layer* (LbL), é um método simples que torna possível projetar arquiteturas em multicamadas com precisão nanométrica (KIM *et al*, 2018). A técnica é baseada na adsorção alternada de polieletrólitos sintéticos ou naturais na superfície das nanopartículas. A modificação da superfície nas

nanopartículas é realizada por interação eletrostática entre as camadas de polieletrólito catiônico e aniônico (CHAPEL *et al*, 2012).

Com base no exposto acima, o objetivo deste trabalho foi desenvolver nanopartículas polieletrólíticas de BSA como modelo de sistema de liberação de fármacos e encapsular a ftalocianina de silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂] como modelo de fotossensibilizador para aplicações em Terapia Fotodinâmica. Sistemas nanoestruturados apresentam tamanho na escala nanométrica e visam contribuir para o aprimoramento tecnológico e científico do país em área inovadora e com potencial elevado de impacto social.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo sintetizar e caracterizar nanopartículas polieletrólíticas de BSA encapsulada com a ftalocianina de silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂] como modelo de sistema de liberação para aplicações em Terapia Fotodinâmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver uma nanopartícula de BSA pelo método de dessolvatação em um único passo;
- Recobrir as nanopartículas de BSA com camadas de polieletrólitos pela técnica de *layer-by-layer*;
- Encapsular o fármaco fotossensibilizador ftalocianina de silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂]
- Determinar as propriedades fotofísicas, fotoquímicas e fotobiológicas do sistema nanoparticulado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

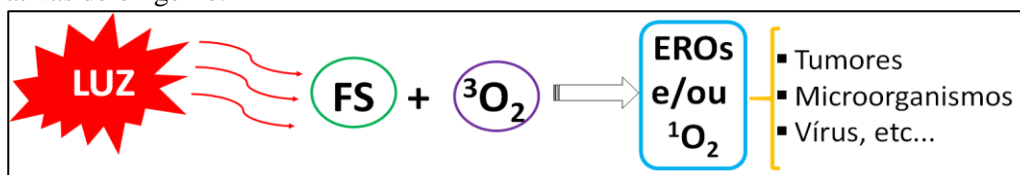
3.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

A terapia fotodinâmica (TFD) foi descoberta a mais de cem anos pela observação serendipista de que microrganismos corados pela laranja de acridina foram inativados quando foram expostos à luz. Não demorou muito tempo, para a TFD ser usada em tratamento de câncer de pele por aplicação tópica de um corante e subsequente iluminação (SADASIVAM *et al*, 2013).

A TFD é uma modalidade terapêutica consolidada que tem sua atividade baseada na foto-oxidação da matéria biológica, a qual é decorrente da atividade de espécies reativas de oxigênio (EROS) e/ou oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$). Essas espécies reativas são geradas pela combinação de luz visível (em comprimento de onda adequado), um fotossensibilizador (FS) e oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) (Figura 2) (RAMOS, 2018).

A TFD foi adotada como uma abordagem minimamente invasiva para o tratamento localizado de tumores superficiais, representando uma melhora no cuidado de pacientes com câncer. Também apresenta comprovada ação contra células microbianas, incluindo bactérias, fungos e vírus. É usado clinicamente para tratar uma ampla gama de condições, incluindo degeneração macular relacionada à idade, psoríase, aterosclerose e mostrou alguma eficácia nos tratamentos antivirais, incluindo herpes (MOHANTY; SENAPATI, 2017).

Figura 2: Esquema geral da TFD, onde FS= fotossensibilizador, EROs = espécies reativas de oxigênio.



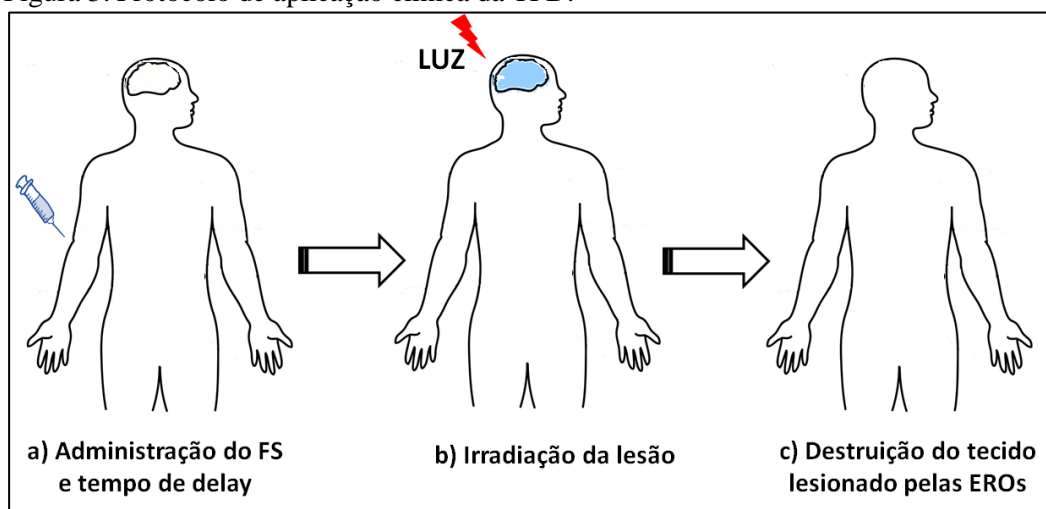
Fonte: o autor.

Os dois componentes que atuam ao mesmo tempo na TFD (o FS e a fonte de luz), são inofensivos por si só para a célula alvo, mas quando combinados e na presença de oxigênio molecular produzem espécies citotóxicas letais, responsáveis pelo mecanismo de morte celular devido a uma cascata de eventos biológicos (CALIXTO *et al*, 2016).

No Brasil, a TFD está sendo aplicada em estudos clínicos e pesquisas experimentais envolvendo o Instituto de Física de São Carlos (Universidade de São Paulo-USP), o Hospital Amaral Carvalho em Jaú, e a Escola de Medicina da Universidade de São Paulo em Ribeirão Preto.

A aplicação clínica da TFD é baseada na administração do FS, por via oral, tópica ou sistêmica e, após um intervalo de tempo suficiente para o seu acúmulo no tecido tumoral (chamado de tempo de *delay*), a região lesionada é irradiada com uma fonte luminosa na região vermelha do espectro eletromagnético (região onde a penetração de luz no tecido é maximizada – 600 a 800 nm, chamada de janela terapêutica). O FS ativado transfere a energia para o oxigênio molecular, gerando espécies reativas do oxigênio que destroem as células tumorais (Figura 3).

Figura 3: Protocolo de aplicação clínica da TFD.



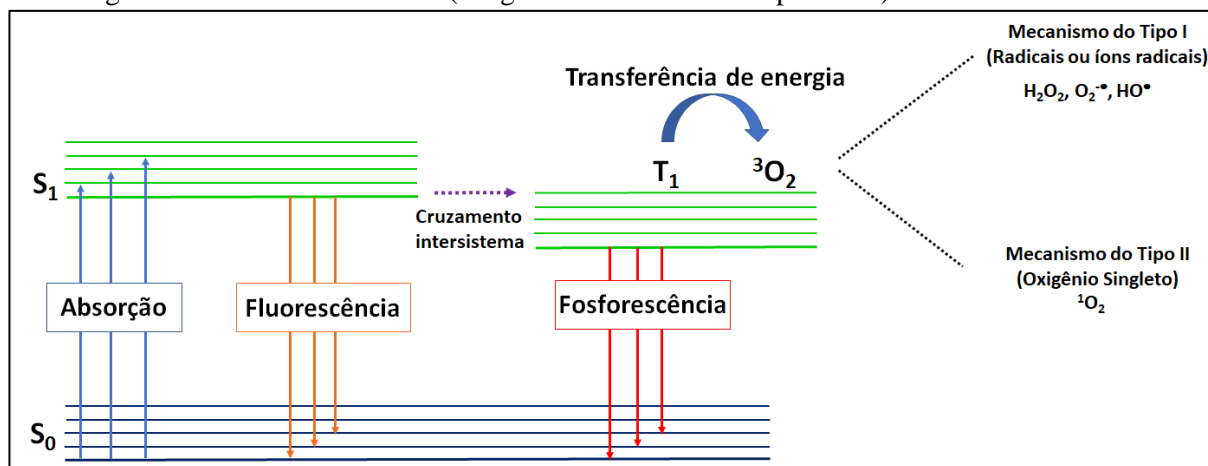
Fonte: o autor.

A produção dessas espécies reativas ocorre de maneira sítio-específica, ou seja, somente no local onde o FS absorveu a luz. Sendo assim, a resposta biológica acontece de maneira seletiva na região onde o tecido alvo foi exposto a iluminação, mantendo intacto o tecido saudável (AVCI; ERDEM; HAMBLIN, 2014).

O processo chave na fotossensibilização é a excitação eletrônica. O fotossensibilizador no estado fundamental (S_0) é ativado, pela absorção de luz, para um estado singlete excitado (S_1). Neste estado, as moléculas podem decair rapidamente voltando ao S_0 com a emissão de luz (fluorescência) ou calor, ou podem sofrer cruzamento intersistema e passar para o estado

triplete. O FS no estado tripleto excitado (T_1) pode decair para o estado fundamental por fosforescência ou sofrer mecanismos de reações para produzir as EROs (Mecanismo do Tipo I e Tipo II) (Figura 4).

Figura 4: Mecanismos da TFD (Diagrama de Jablonski simplificado).



Fonte: o autor.

O FS no estado tripleto excitado, na presença de oxigênio molecular, pode transferir próton ou elétron para um substrato para formar espécies reativas de oxigênio como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila ($\cdot OH$) (mecanismo do tipo I). No mecanismo do tipo II, a energia do FS no estado tripleto excitado pode ser transferida para o oxigênio molecular para formar oxigênio singlete (1O_2) (mecanismo tipo II), sendo este considerado a principal espécie citotóxica em TFD (SANTOS *et al*, 2018), ocasionando danos celulares em diversas organelas como aparelho de Golgi, lisossomos, membranas plasmáticas, mitocôndria, núcleo e retículo endoplasmático (MACHADO *et al*, 2005).

3.2 FOTOSSENSIBILIZADORES

O interesse na TFD começou com a descoberta e estudo do derivado de hematoporfirina (HpD) por Lipson e Schwartz na Mayo Clinic em 1960, e acelerados por estudos pioneiros em ciência básica e aplicação clínica por Dougherty e colaboradores. Em 1983, uma forma parcialmente purificada de HpD, comercialmente conhecida como Photofrin®, foi desenvolvido. Photofrin® foi o primeiro FS a receber aprovação regulatória

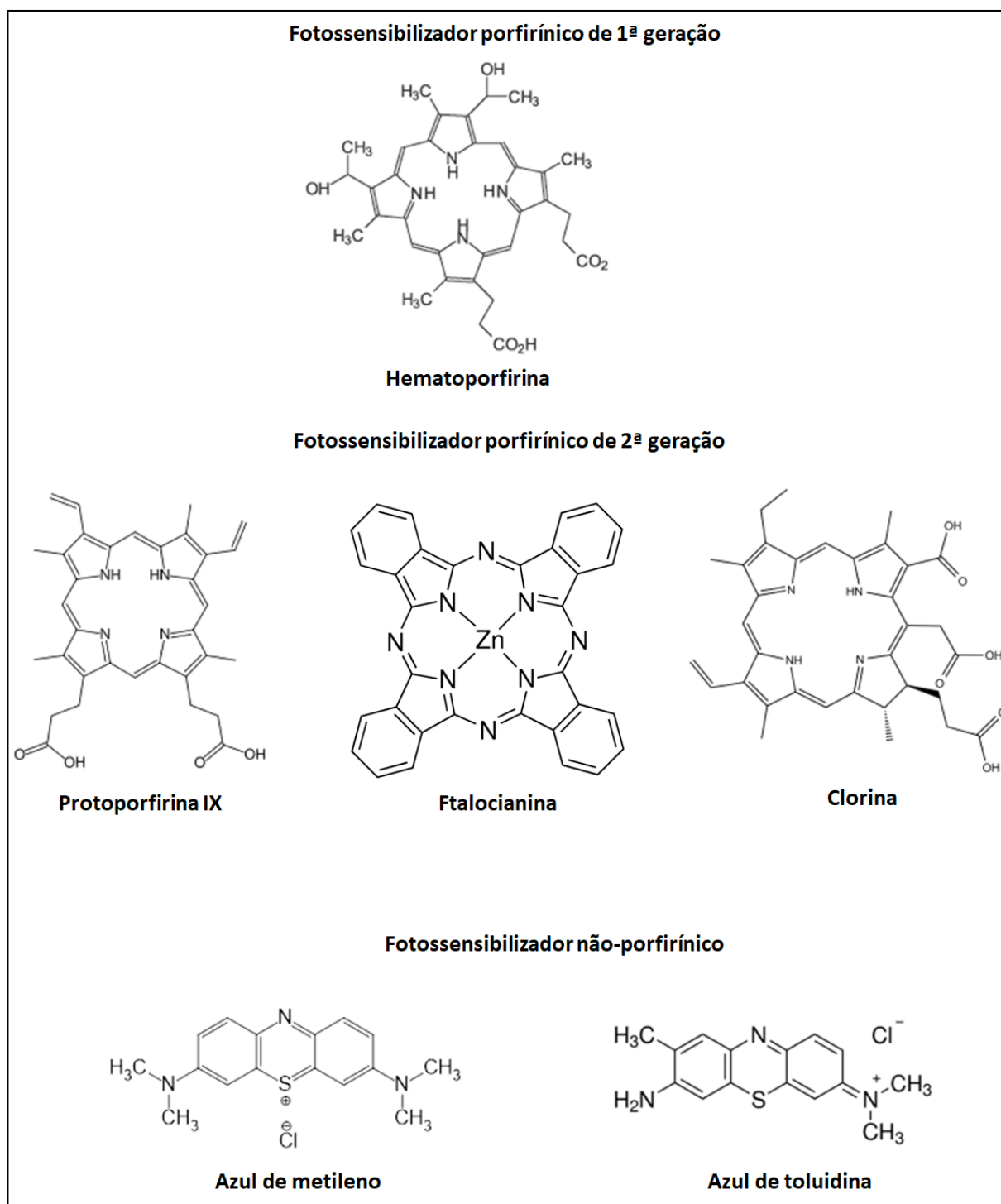
para tratamento de vários tipos de cânceres em mais de 40 países em todo o mundo, incluindo os Estados Unidos (YOON; LI; SHIM, 2013).

Os FS são classificados em porfirinas (de 1^a e 2^a geração) e não porfirinas (Figura 5). As porfirinas são geralmente conhecidas como a primeira geração de fotossensibilizadores baseados na hematoporfirina. Estes FS apresentam algumas limitações para uso clínico em TFD, tais como (CALIXTO *et al*, 2016);

- ✓ Fraca absorção na região da “janela terapêutica” (região de 600-800 nm), limitando a eficiência da TFD;
- ✓ Lenta eliminação do organismo, o que ocasiona fotossensibilidade prolongada;
- ✓ Baixa seletividade pelo tecido tumoral;
- ✓ Dificuldade de isolamento e purificação destes compostos, uma vez que são misturas de HpD;
- ✓ Baixo coeficiente de extinção molar, o que demanda maiores doses para resposta ao fototratamento.

Devido a esta gama de restrições apresentadas pelos fotossensibilizadores de 1^a geração, o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores que apresentem maior eficácia se tornou de grande importância, tal como a síntese de compostos como os derivados da porfirina, as clorinas, as ftalocianinas, classificados como fotossensibilizadores de 2^a geração (CAIXETA, 2018).

Figura 5: Classificação dos fotossensibilizadores.



Fonte: o autor.

Quando comparado aos FS de 1ª geração, os compostos de 2ª geração apresentam as seguintes vantagens (CALIXTO *et al*, 2016):

- ✓ Baixa toxicidade no escuro;

- ✓ Seletividade ao tecido alvo;
- ✓ Bons geradores de oxigênio singleto;
- ✓ Elevada absorção de luz em comprimento de onda onde a penetração de luz no tecido é maximizada (600-800 nm);
- ✓ Rápida eliminação do organismo, o que minimiza os efeitos secundários como a fotossensibilidade cutânea.

3.3 Ftalocianinas

As Ftalocianinas foram descobertas no início do último século por um acidente, quando uma solução de 2-cianobenzamida foi aquecida em altas temperaturas, fornecendo então um composto escuro e insolúvel, porém não foi muito estudado. Em 1927 Diesbach e Von der Weid estavam preparando a reação de 1,2-dibromobenzeno com cianeto de cobre e obtiveram uma mistura (que chamaram de ftalocianinato de cobre). Já em 1928, ocorreu um acidente em uma indústria, onde a ftalimida entrou em contato com o a camada de ferro de um reator, produzindo então uma substância escura, altamente insolúvel e termicamente estável, verificando assim a ftalocianina de ferro. (GOMES, 2014).

Foi então que o químico inglês Sir Patrick Linstead, em 1932, mostrou que ambos os pigmentos, eram complexos de ftalocianinas de cobre e ferro, respetivamente. Por conta de seu trabalho nos anos seguintes foram possibilitados a produção a nível industrial deste composto (ROTELOK, 2013).

As ftalocianinas são classificadas como a segunda geração de fármacos fotossensibilizadores e semelhante as porfirinas, porém, mais promissores para tratamentos clínicos, pelo fato de seu alto coeficiente de absorbância, com ótima penetração de luz e ação fotodinâmica (CALIXTO *et al.*, 2016).

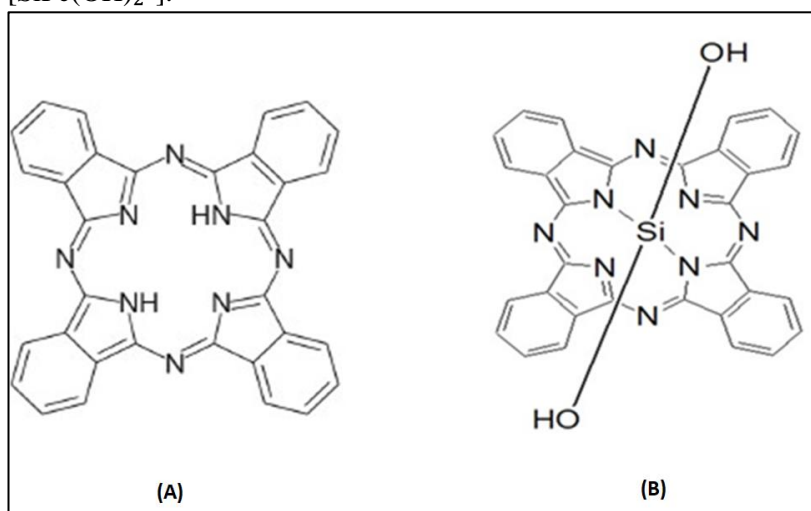
Elas apresentam propriedades fotofísicas e fotoquímicas superiores as porfirinas, incluindo: síntese simples e possibilidade de modificação para alterar a hidrofiliidade; alta foto estabilidade química; absorção em longo comprimento de onda com altos coeficientes de extinção molar (absorção muito mais intensa na região de 650-750 nm) e altos rendimentos quânticos de oxigênio singleto. Como as porfirinas, as ftalocianinas coordenam os íons metálicos em seu núcleo, o que oferece inúmeras opções para controlar suas propriedades físicas por modificações sintéticas (CALIXTO *et al.*, 2016).

O espectro de absorção das ftalocianinas é formado por um conjunto de bandas principais, denominadas de: banda-B (ou banda Soret) e das bandas Q, que se encontram na região do ultravioleta ou radiação ultravioleta (300-350 nm) e na região de luz visível (UV-VIS) (600-700 nm), respectivamente (JAYME, 2018).

A ftalocianina de silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂] é definida como um macrociclo tetrapirrólico com um íon de silício como metal central e apresenta limitada solubilidade em água, ou seja, em meio fisiológico.

Joyner e Kenny relataram em 1961 um poli- (SiPcO)_n onde foi obtido por polimerização, por desidratação ou por aquecimento de [SiPc(OH)₂]. A família da ftalocianina é conhecida principalmente por se tornar eletricamente condutivo por dopagem de iodo (KAWASE *et al*, 1993).

Figura 6: (A): Estrutura molecular base das ftalocianinas; (B): Estrutura molecular da silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂].



Fonte: o autor.

As ftalocianinas podem ser divididas em duas classes, no aspecto de solubilidade: ftalocianinas solúveis em água, que podem ser injetadas diretamente na corrente sanguínea e ftalocianinas hidrofóbicas, que devem ser administradas usando algum tipo de sistema de entrega como os sistemas de liberação controlada de fármacos. Dessa maneira a forma como o FS é entregue à célula também é importante, ou seja, se está presente na solução ou ligado ao sistema de veiculação específico, esse fato influenciará a eficiência geral do processo fotodinâmico. Ambiente com heterogeneidade de meio, como sistemas biológicos, células e

os tecidos, os parâmetros estruturais e funcionais são envolvidos diretamente na determinação da eficiência do processo de fotossensibilização (JAYME, 2018).

Para melhorar o efeito fotodinâmico de um composto porfirínico, minimizando os problemas como: agregação, pouca ou nenhuma solubilidade em ambiente aquoso, falta de penetração na célula e baixa seletividade para o tecido tumoral, uma das alternativas é promover o encapsulamento do FS em sistemas encapsuladores chamados de sistemas de liberação controlada de fármacos (SILVA, 2016).

3.4 Sistema de Liberação

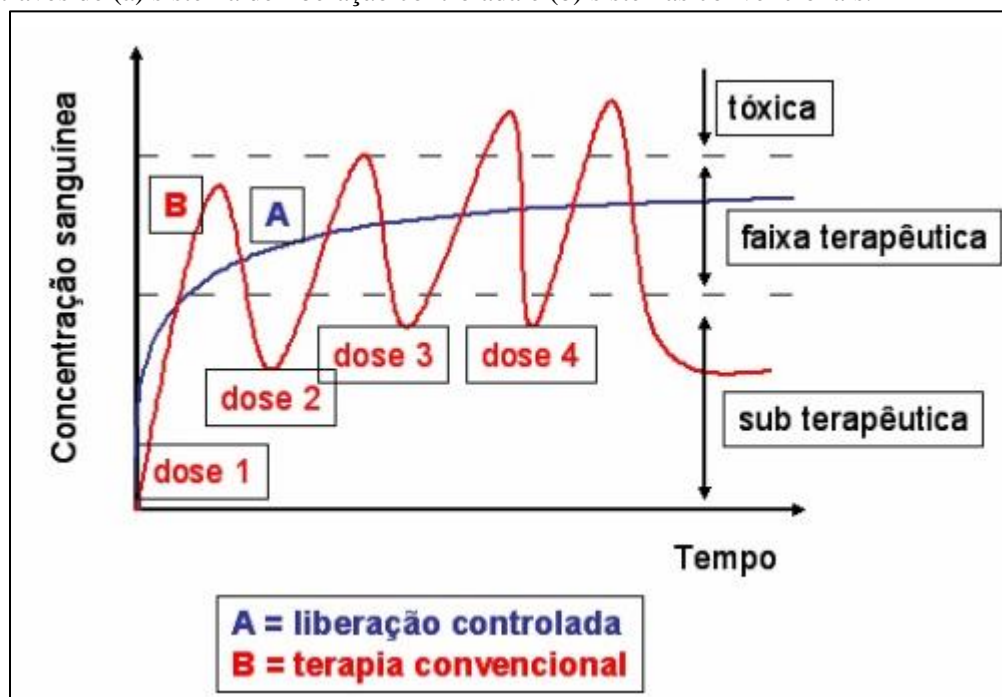
Segundo a *European Medicines Agency*, o uso de estruturas com dimensão na região de 100 nm é considerado como nanoestruturas. Na área da nanotecnologia farmacêutica e de nanomedicina, nanomedicamentos estão sendo desenvolvidos com o intuito de se obter benefícios em relação aos correspondentes na forma convencional. Para que nanoformulações sejam desenvolvidas, os materiais que serão utilizados na composição são avaliados e características como biodegradabilidade, biocompatibilidade, capacidade para funcionalização de superfície, conjugação, complexação e encapsulamento são essenciais para a seleção do mesmo (DIMER *et al*, 2013).

Atualmente os sistemas de veiculação de fármacos (DDS) possuem plataformas para transporte de fármacos, com base em materiais sintéticos e naturais e tem como principal ponto de vista tratar os problemas dos fármacos convencionais e melhorar as propriedades farmacológicas do mesmo (JAYME, 2018; MA-HAM *et al*, 2011). Hoje em dia existe um grande interesse em pesquisas e estudos focados no desenvolvimento de sistemas de veiculação de fármacos e ativos mais eficientes com intuito de melhorar a sua eficácia terapêutica (JAYME, 2018).

Métodos convencionais estão sendo desenvolvidos para que os agentes ativos (moléculas bioativas) ou terapêutico (fármaco ou drogas) sejam liberados. Normalmente utiliza-se sistemas de diluentes solúveis onde a dissolução do agente seja favorável, apesar de que manter os níveis de sua concentração dentro da faixa terapêutica ainda seja um grande desafio. Em terapias convencionais de administração, a concentração da droga na corrente sanguínea aumenta até atingir o maior nível de dissolução e então reduz, onde deve-se administrar uma nova dose para que os níveis de concentração se mantenham. O objetivo dos

sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem e minimizando os efeitos colaterais (BIZERRA; SILVA, 2016).

Figura 7: Concentração de droga no sítio terapêutico de ação após sua liberação através de (a) sistema de liberação controlada e (b) sistemas convencionais.

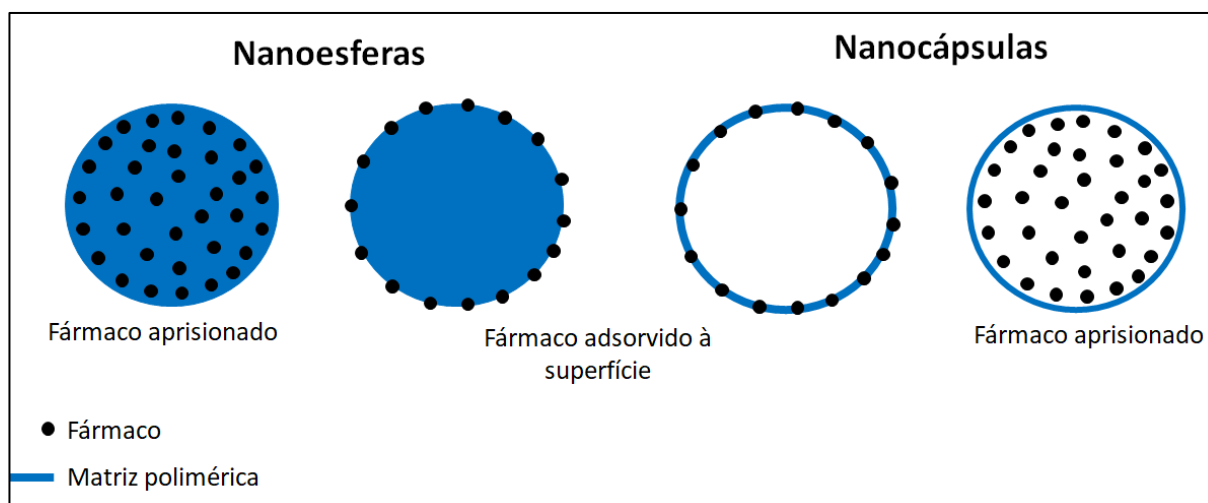


Fonte: adaptado de Brannon-peppas, 1997.

As nanopartículas poliméricas, lipossomas, ciclodextrinas e dendrímeros são alguns dos nanossistemas utilizados para que ocorra o carregamento dos fármacos no sistema de liberação. As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos que apresentam diâmetro inferior a $1\mu\text{m}$. As nanopartículas são classificadas em dois tipos de estruturas diferentes: nanocápsulas e nanoesferas. (BIZERRA; SILVA, 2016).

As nanoesferas e nanocápsulas fazem parte da classificação das nanopartículas, e elas são diferenciadas em sua composição e organização estrutural (Figura 8). As nanocápsulas são constituídas por um invólucro polimérico disposto ao redor de um núcleo oleoso, podendo o fármaco estar dissolvido neste núcleo e/ou adsorvido à parede polimérica. Por outro lado, as nanoesferas, que não apresentam óleo em sua composição, são formadas por uma matriz polimérica, onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al*, 2013).

Figura 8: Representação esquemática de uma nanoesfera ou nanocápsula.



Fonte: o autor.

A tecnologia associada à modificação da liberação de fármacos, ou outras substâncias bioativas, a partir de preparações farmacêuticas sofreu um incremento notório nas últimas décadas na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas de liberação controlada (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

A liberação controlada de fármaco utiliza como métodos de liberação, os sistemas de difusão, dissolução e o osmótico, onde é possível utilizar o sistema de reservatório e o sistema matricial (FERREIRA, 2019; LIMA, 2010).

A liberação do fármaco ocorre em dois tipos de mecanismos diferentes a difusão do fármaco e erosão da matriz. (FERREIRA, 2019; BIZERRA; SILVA, 2016)

Na difusão o agente bioativo está envolvido por uma membrana polimérica ou um filme, ou disperso uniformemente em uma matriz. A difusão ocorre por um gradiente de concentração. Alguns polímeros, entretanto, não são adequados para a veiculação de substâncias hidrossolúveis e de baixa massa molar, uma vez que elas se difundem através da rede polimérica, independente da velocidade de degradação matricial (BIZERRA; SILVA, 2016).

Na matriz hidrofílica, a água presente penetra na superfície do fármaco e hidrata o polímero, que se umidifica e forma uma camada de gel. O fármaco contido nessa camada dissolve e difunde a partir da matriz ou é liberado quando ela sofre erosão (FERREIRA, 2019).

A importância dos sistemas de liberação reside no fato de que raramente um fármaco, veiculado em solução aquosa ou numa forma convencional em meio orgânico, consegue atingir um alvo específico no organismo em concentrações adequadas para provocar o efeito terapêutico esperado, ou sem causar efeitos citotóxicos indesejáveis (SILVA, 2016).

3.5 Nanopartículas de BSA

As nanopartículas (NPs) são consideradas partículas de tamanho submicrométricos, e apresentam inúmeras vantagens como sistema de entrega de FS como por exemplo: proteção do FS contra a sua degradação enzimática, controle de liberação do FS proporcionando uma concentração constante e uniforme nas células alvo (devido ao seu tamanho estas nanopartículas conseguem entrar na célula alvo) e biocompatibilidade (CALIXTO *et al*, 2016)

Entre os sistemas transportadores de fármaco nanoestruturados disponíveis, as nanopartículas preparadas com proteínas (por exemplo, albumina, gelatina) são biocompatíveis, biodegradáveis, não antigênicas e relativamente fáceis de preparar. Além disso, as nanopartículas de proteína podem se ligar a muitas drogas de uma maneira relativamente não específica. Devido à sua carga de superfície, os fármacos podem adsorver fisicamente na superfície da proteína ou podem ligar-se covalentemente à matriz.

Albumina sérica bovina (BSA) e albumina sérica humana (HSA) têm sido amplamente utilizadas nos últimos 30 anos para preparar micro e nanopartículas. Mais de 100 moléculas ativas ou diagnósticas diferentes foram incorporadas em partículas de albumina para serem administradas por diferentes vias, incluindo rotas intravenosas, intramusculares, nasais e oftálmicas (YEDOMON; FESSI; CHARCOSSET, 2013).

A albumina é uma proteína importante no plasma sanguíneo, e tem um grande potencial como um nanocarreador em sistemas de entrega de drogas. É amplamente usado em sistemas colóides nanoparticulados devido à sua não-toxicidade e propriedades biodegradáveis. Muitas moléculas orgânicas e inorgânicas pode interagir facilmente com nanopartículas de albumina devido aos grupos funcionais na superfície da partícula. A albumina aumenta a solubilidade de moléculas hidrofóbicas no sangue e atua como um transportador para diferentes substâncias. Assim, pode fornecer vários elementos aos tecidos específicos do corpo e influenciar o destino de uma molécula no sangue (JAHANBAN-ESFAHLAN; DASTMALCHI; DAVARAN, 2016).

Além disso, a albumina é uma proteína solúvel e estável em uma ampla faixa de pH e até 60 °C. Portanto, é uma proteína adequada para a preparação de nanopartículas, que são amplamente utilizadas em sistemas de liberação de fármacos coloidais (OZGUR *et al*, 2011; CHEN *et al*, 2009; KRATZ, 2008; SHARMAN *et al*, 2004).

A BSA tem sido amplamente utilizada para tais investigações devido à sua semelhança estrutural intrínseca à albumina sérica humana (SKRT *et al*, 2012).

Emulsificação e dessolvatação (ou coacervação) são os dois principais métodos descritos para a preparação de partículas de albumina. A primeira técnica envolve a emulsificação da solução de albumina, uma fase oleosa e solidificação por desnaturação térmica ou química e reticulação usando formaldeído ou glutaraldeído (YEDOMON; FESSI; CHARCOSSET, 2013).

O processo de dessolvatação foi usado com sucesso para produzir nanopartículas de HSA (SADEGHI *et al*, 2014). Dessolvatação (ou coacervação) de albumina com solventes orgânicos seguido por reticulação química é um método comumente usado para a preparação de nanopartículas de albumina. A adição de agentes dessolvatantes, como etanol ou acetona, separa e coacerva as moléculas poliméricas na fase aquosa (SOPPIMATH *et al*, 2001). A auto-montagem das moléculas de polímero ocorre com interações eletrostáticas, uma vez que a energia livre geral no sistema é minimizada durante a dessolvatação (ARNEDO; ESPUELAS; IRACHE, 2002). Assim, as moléculas poliméricas formam partículas de diferentes formas e tamanhos, dependendo das condições de preparação (LANGER *et al*, 2003). Portanto, é necessário um equilíbrio entre forças atrativas e repulsivas para a fabricação de partículas de tamanho apropriado. A supressão das interações hidrofóbicas fornecem uma maneira de controlar o tamanho das partículas poliméricas durante a dessolvatação (YEDOMON; FESSI; CHARCOSSET, 2013). Depois de terminar a adição do agente de dessolvatação, um agente reticulante como a solução de glutaraldeído deve ser adicionado para estabilizar as partículas instáveis e a condição de agitação constante para a suspensão preparada over night para completar a reticulação de todos os resíduos de aminoácidos na proteína (JAHANBAN-ESFAHLAN; DASTMALCHI; DAVARAN, 2016).

A preparação de nanopartículas de albumina por dessolvatação envolve três procedimentos: (1) um sistema disperso instável (coacervatos) é obtido pela adição de um agente dissolvente (geralmente etanol ou acetona) a uma solução aquosa da proteína; (2) os coacervatos são endurecidos por reticulação química; (3) as nanopartículas resultantes são

purificadas e eventualmente liofilizadas ou secas por pulverização (CHEN *et al*, 2009). A técnica permite o controle do tamanho das partículas e do índice de polidispersidade por condições variáveis como o valor do pH, a composição iônica e a concentração do solução de albumina (LANGER *et al*, 2003).

3.6 Layer-by-Layer

A montagem de camada por camada, conhecida por *layer-by-layer* (LbL), é um método simples que permite projetar arquiteturas de multicamadas com precisão nanométrica. A técnica baseia-se na adsorção alternada de polieletrólitos sintéticos e/ou naturais nas superfícies de nanopartículas (AN; HUANG; SHI, 2018). A modificação da superfície nas nanopartículas é empregada por interações eletrostáticas entre a bicamada polieletrólítica catiônica e aniônica (CARVALHO *et al*, 2018).

A montagem da multicamada LbL é considerada um processo cíclico em que o material é carregado ou adsorvido em um substrato e logo após lavado, onde um material de carga oposta é adsorvido na parte superior da primeira camada. Este processo constitui uma única bicamada com uma espessura em ordem de nanômetros e o processo de deposição pode ser repetido até o final do filme de multicamadas (RICHARDSON; BJÖRNMALM; CARUSO, 2015).

A simplicidade, versatilidade e controle em nanoescala que a montagem LbL oferece desta as tecnologias mais utilizadas para o revestimento de substratos planares e particulados em uma ampla variedade de campos, incluindo óptica, energia, catálise, separações e biomedicina (RICHARDSON; BJÖRNMALM; CARUSO, 2015).

Na maior parte do padrão de liberação de drogas, a liberação bifásica é mais comum e inclui dois estágios: uma fase inicial de liberação imediata das drogas associadas (aquelas que interagiram fracamente) com as nanopartículas e, em seguida, uma segunda fase de drogas covalentemente ligadas (fortemente ligadas) são liberadas em difusão lenta da matriz, exibindo liberação prolongada e sustentada. A liberação do *burst* inicial ocorre devido à fraca adsorção de medicamentos na superfície dos sistemas nanoparticulados (CARVALHO *et al*, 2018). Uma possibilidade para reduzir a taxa de liberação e suprimir a liberação inicial é encapsular a droga em partículas recobertas com filmes poliméricos finos, como por exemplo a construção de camadas polieletrólíticas em nanopartículas poliméricas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Os procedimentos foram realizados no laboratório de síntese orgânica localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba.

4.1 Materiais

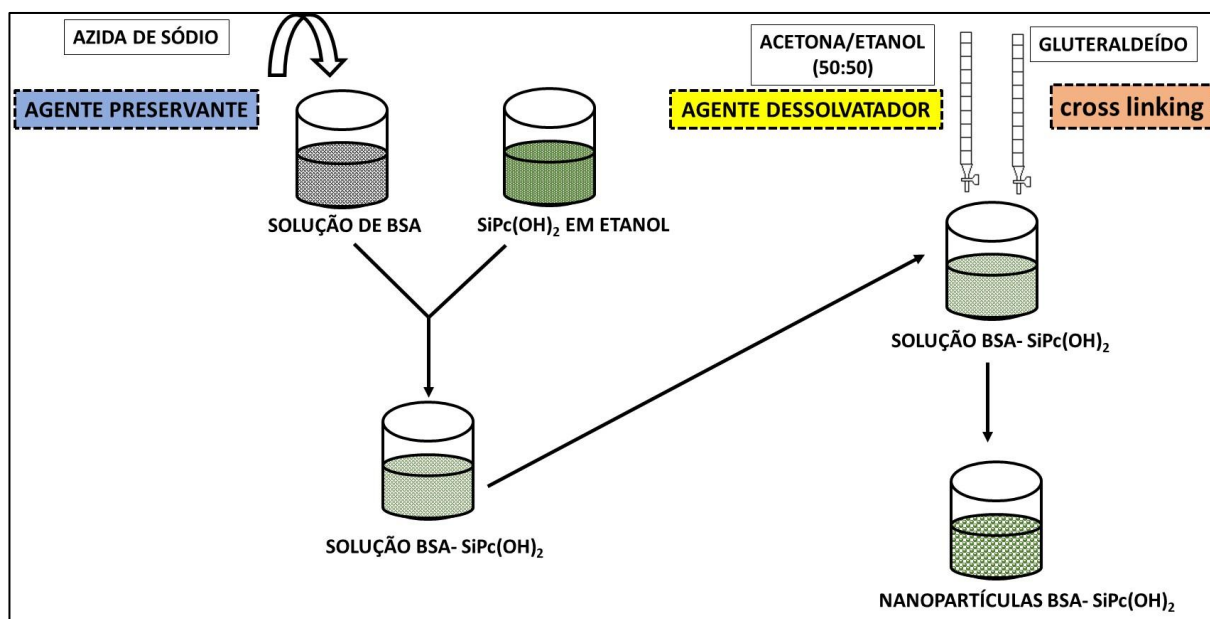
Soro albumina bovina (BSA), poli(estireno sulfonato de sódio) (PSS), poli(alilamina hidrocloreada) (PAH), ftalocianina de silício di-hidróxido, glutaraldeído, azida de sódio, acetona/etanol, foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os solventes utilizados foram da marca Synth,

4.2 Preparação do BSA

As nanopartículas polieletrólíticas de BSA- SiPc(OH)₂ (NPBSA- SiPc(OH)₂) foram preparadas pelo método de dessolvatação de uma etapa, conforme mencionado por Sadeghi *et al*, 2014 com modificações. A BSA em pó foi dissolvida em água MilliQ a uma concentração final de 1% de BSA (m/m) e seu pH foi ajustado 9,0 com NaOH 0,1 mol. L⁻¹ e agitado com um agitador magnético durante 30 min.

Todas as soluções continham 0,01% de azida de sódio como conservante. As nanopartículas foram formadas por adição gota a gota do agente de dessolvatação (acetona/etanol) sob agitação constante a 1300 rpm. Imediatamente após a adição de acetona/etanol, adicionou-se 0,2 mL de uma solução aquosa de glutaraldeído (25%) à mistura e agitou-se durante 1 h para promover a reticulação das nanopartículas. Após a dessolvatação, a suspensão foi diluída (1:100) em água MilliQ para reduzir a concentração do agente de dessolvatação para menos de 1% (Figura 9).

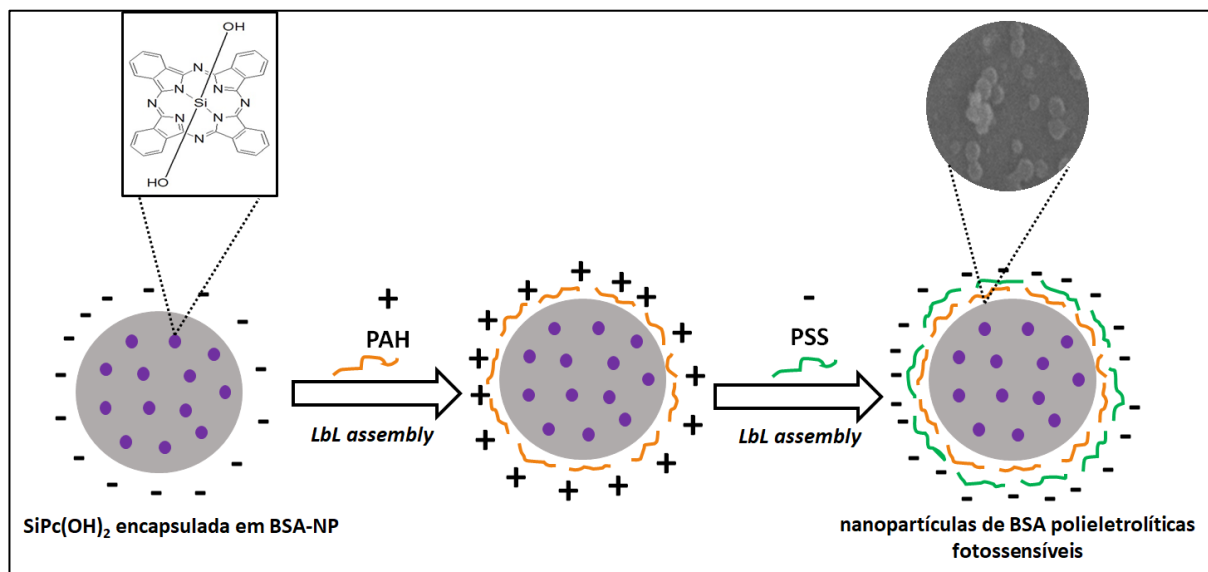
Figura 9: Preparação das nanopartículas polieletrólíticas de BSA.



Fonte: o Autor.

As soluções ($2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) de PAH e PSS utilizadas para a montagem da bicamada polieletrólítica foram preparadas em água DI. As nanopartículas de BSA 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 desionizada. Para o carregamento da SiPc(OH)₂ nas nanopartículas de BSA polieletrólítica, 1 mL de SiPc(OH)₂ $5,0 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ (em etanol) foi adicionado na solução por 48 horas (Figura 10).

Figura 10: Esquema de preparação das nanopartículas polieletrólíticas de BSA fotossensíveis.



Fonte: o autor.

4.3 Caracterização Morfológica

A morfologia externa das NPBSA- SiPc(OH)₂ foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento EVO-MA10 (Zeiss-Alemanha).

4.4 Caracterização físico-química de nanopartículas de NPBSA- SiPc(OH)₂

O tamanho de partícula e o potencial zeta das NPBSA- SiPc(OH)₂ foram medidos usando espalhamento dinâmico de luz (DLS) (Malvern Zetasizer Nano ZS, Malvern, Reino Unido). Para a medição do DLS, as partículas foram dispersas em água destilada e medidas em um ângulo de dispersão de 173 ° à temperatura ambiente. Para o teste de estabilidade, a distribuição de tamanho e o potencial zeta da amostra foram coletadas em diferentes tempos de armazenamento por 90 dias.

4.5 Espectroscopia de absorção UV-vis no estado estacionário

As propriedades fotofísicas das NPBSA-SiPc(OH)₂ 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 0,5 – 1,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ 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.

4.6 Rendimento do processo (%)

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

$$Y (\%) = \left[\frac{(\text{peso das nanopartículas})}{(\text{peso de polímero e FS})} \right] \times 100$$

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

4.7 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE)

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

$$EE (\%) = \left[\frac{(\text{peso do SiPc(OH)}_2 \text{ total} - \text{peso do SiPc(OH)}_2 \text{ no sobrenadante})}{(\text{peso do SiPc(OH)}_2 \text{ total})} \right] \times 100$$

Uma curva de calibração padrão do pico máximo de absorção (a 676 nm) *versus* concentração, usando concentrações conhecidas de SiPc(OH)₂ em etanol, foi plotada para determinar SiPc(OH)₂ livre.

4.8 Avaliação do desempenho de liberação do fármaco *in vitro*

Para avaliar o desempenho de liberação de drogas *in vitro* do FS a partir de nanopartículas polieletrólíticas de BSA foram dispersas, 5,0 mg 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) foi retirado e substituído por solução fresca de PBS (3 mL) para continuar a avaliação da liberação do medicamento. A concentração de SiPc(OH)₂ no sobrenadante foi determinada pela absorbância UV-Vis a 676 nm, usando uma curva de calibração de SiPc(OH)₂ puro em etanol. Os dados foram relatados como média ± DP, com base em medidas triplicadas.

4.9.a 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 (SIMIONI *et al.*, 2011).

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 CO₂. Para o teste *in vitro*, foram utilizadas microplacas de 24 poços.

4.9.b Ensaio de citotoxicidade das NPBSA- SiPc(OH)₂

Para avaliar o efeito citotóxico intrínseco das das NPBSA- SiPc(OH)₂, as células foram mantidas no escuro e incubadas com uma mistura de meio fresco e nanopartículas polieletrólíticas de BSA encapsuladas com o FS em concentrações finais de 0,5; 0,9; e 1,2 μmol.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% CO₂, 37 °C) em meio fresco por mais 24 horas, até foi realizado o ensaio de viabilidade celular descrito na Seção 4.10. 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 SiPc(OH)₂ nanoencapsulado. Também foi testado as mesmas concentrações de FS em sua forma livre, ou seja, quando não associado a um sistema de liberação.

4.9.c Ensaio de fotocitotoxicidade das NPBSA- SiPc(OH)₂ em células de melanoma de camundongo

Para avaliar o efeito fototóxico de SiPc(OH)₂ nanoencapsulado, as células de melanoma foram tratadas com meio contendo NPBSA- SiPc(OH)₂ a 0,5; 0,9; e 1,2 μmol.L⁻¹ (5% CO₂, 37 °C). Após 3 h de incubação, o meio carregado com SiPc(OH)₂ nanoencapsulado foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS.

As células foram expostas a doses de 10 J.cm⁻². Após as irradiações, o meio incolor foi removido e as células foram incubadas novamente (5% CO₂, 37 °C) em meio fresco por 24 horas adicionais até que o ensaio de viabilidade celular MTT fosse conduzido, conforme descrito na Seção 4.10. As células de controle foram incubadas apenas com o meio de cultura e sem irradiação leve (células não tratadas). O ensaio de fotocitotoxicidade foi realizado em triplicata, com oito poços para cada dose de luz. Também foi testado as mesmas concentrações de FS em sua forma livre, ou seja, quando não associado a um sistema de liberação.

4.10 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 μL de solução MTT (5 mg.mL⁻¹) e 420 μL 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 CO₂ 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 2-propanol. 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%.

4.11 Análise estatística

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

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Fabricação do sistema nanoparticulado

Solventes orgânicos como acetona e etanol podem promover a nucleação e a precipitação de moléculas de BSA a serem agregadas porque a BSA é insolúvel nestes meios e o processo de agregação resulta espontaneamente em nanopartículas. O tipo de agente de dessolvatação afeta claramente o tamanho das partículas e a distribuição das nanopartículas de BSA (SAILAJA; AMARESHWAR, 2010; RAHIMNEJAD; NAJAFPOUR; BAKERI, 2012)

O uso da acetona / etanol (50:50) foi escolhido com base em estudos anteriores, conforme descrito por Sadeghi *et al* (2014) que demonstraram que uma mistura de etanol e acetona levou às nanopartículas mais esféricas. O volume e a velocidade da adição do agente de dessolvatação afetam o tamanho das partículas obtidas (DREIS *et al*, 2007; SEBAK *et al*, 2010).

De acordo com os estudos de Langer *et al* (2003), a vazão da adição do agente de dessolvatação na velocidade de 1,0-2,0 mL.min⁻¹ produziu nanopartículas com tamanho em torno de 100 nm. Por esse motivo, em todas as experiências na investigação atual, adicionou-se acetona / etanol com a vazão de 1,0 ml.min⁻¹ usando um aparelho projetado.

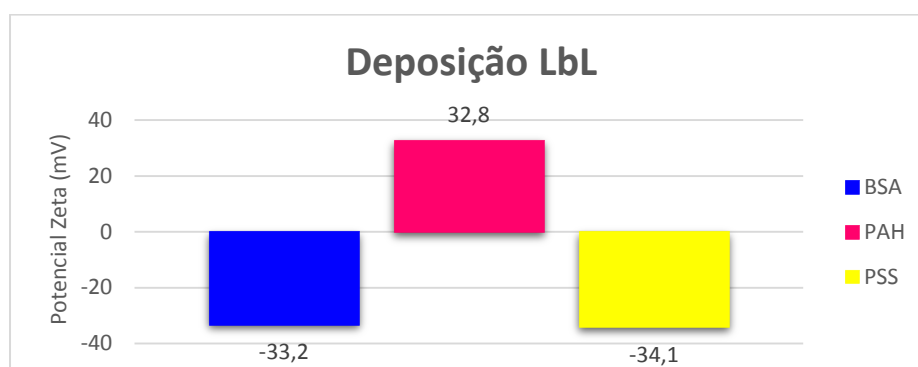
Todas as preparações de nanopartículas aqui descritas foram estáveis durante o período de avaliação de 90 dias sem degradação do fotossensibilizador ou alterações na solução (como cremação por precipitação ou separação de fases) e mantiveram perfis espectroscópicos e fotofísicos. O tratamento com glutaraldeído que reticula moléculas de BSA na superfície e no interior das nanopartículas pode melhorar a estabilidade consistente com observações anteriores da literatura (ZHAO *et al*, 2010; LI *et al*, 2013).

Após o término da adição do agente de dessolvatação, o glutaraldeído é adicionado e a condição de agitação continua durante a noite reticulando resíduos de aminoácidos nas proteínas para criar nanopartículas de BSA (JAHANBAN-ESFAHLAN; DASTMALCHI; DAVARAN, 2016).

A suspensão de NPBSA- SiPc(OH)₂ foi armazenada a 4 °C. Essa temperatura foi relatada como indicado por não haver diferenças significativas no tamanho, potencial zeta e valores de PDI (índice de polidispersividade) em nanopartículas (RAO *et al*, 2006).

Uma combinação de par de policação/poliânion (PAH/PSS – policação fraco/poliânion forte) foi usada para formar um revestimento LbL em torno de nanopartículas de BSA de 230 nm. A superfície das nanopartículas de BSA não revestidas é negativa com uma carga superficial de - 33,2 mV. A mudança para +32,8 mV para a camada PAH e -34,1 mV para a camada PSS (figura 11). A mudança óbvia do potencial zeta indica uma deposição alternada bem-sucedida do policação PAH e do poliânion PSS diretamente nas nanopartículas de BSA. Shutava *et al* (2009), mostraram resultados semelhantes para nanopartículas de gelatina LbL carregadas com polifenóis naturais.

Figura 11: Deposição da camada LbL



Fonte: o autor.

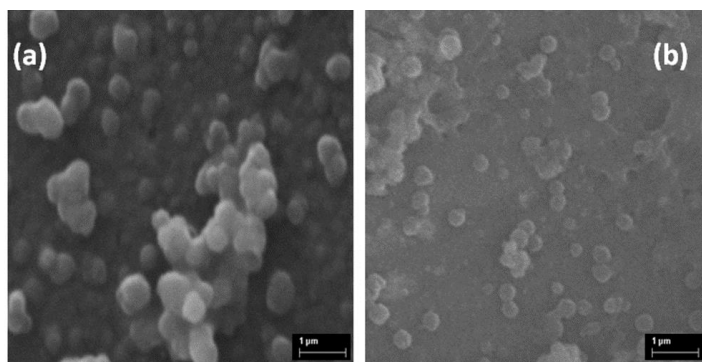
5.2 Caracterização morfológica

Uma micrografia eletrônica de varredura do sistema nanoparticulado produzido é mostrada na Figura 12, que mostra claramente que foram produzidas nanopartículas lisas e esféricas. A imagem indica que não aparecem fissuras ou heterogeneidade na superfície das nanopartículas. Apresentando uma evidência morfológica para nanopartículas lisas.

O MEV das nanopartículas polieletrólíticas de BSA desenvolvidas pelo método de dessolvatação em um passo mostra que nanopartículas esféricas com um diâmetro médio de 100nm foram produzidas, na ausência e presença do fármaco fotossensibilizador.

A ausência ou a presença de fotossensibilizador não causou alteração na minha caracterização morfológica observada pelo MEV.

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



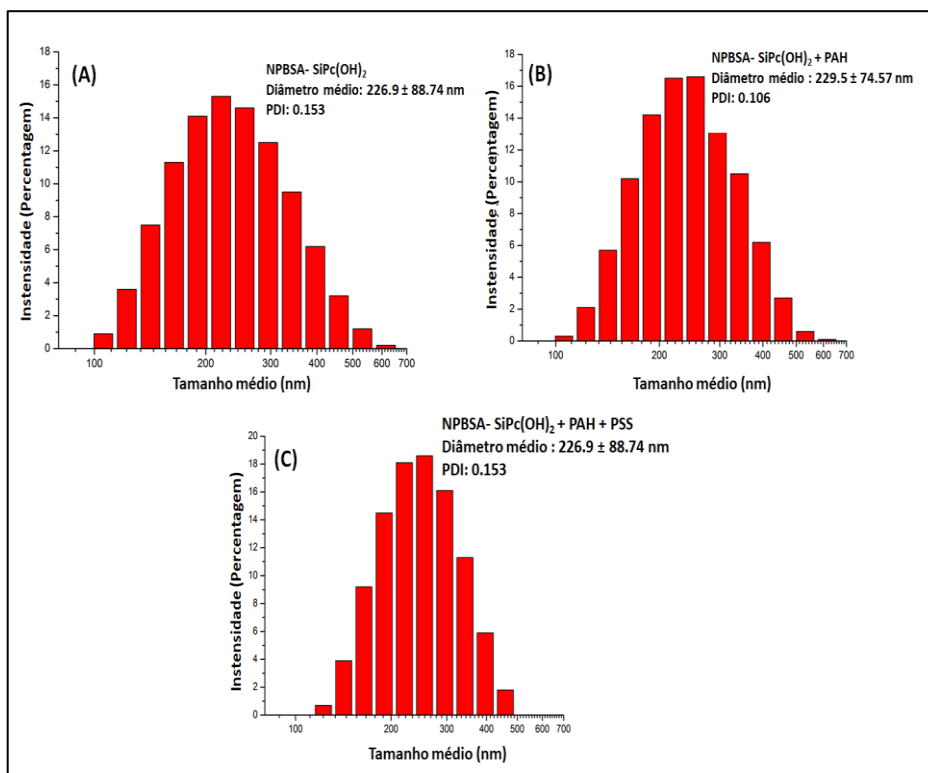
Fonte: o autor.

5.3 Caracterização físico-química de nanopartículas de NPBSA- SiPc(OH)₂

A distribuição de tamanho da nanopartícula medida por espectroscopia de correlação de fótons (PCS) é exibida na Figura 13. Verificou-se que a formulação final apresentou uma distribuição de tamanho estreita (Índice de Polidispersidade (PDI) = 0,153) com um diâmetro hidrodinâmico médio de volume de $226,9 \pm 88,74$ nm.

Estes resultados demonstraram que o processo de dessolvatação combinado com a técnica de *layer-by-layer* é adequada para obter nanopartículas polieletrólíticas de BSA com tamanho e PDI desejáveis.

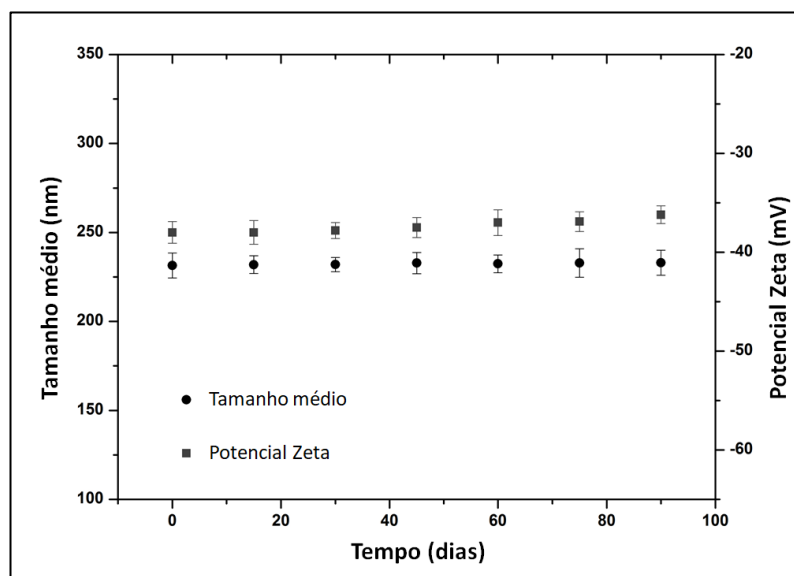
Figura 13: Distribuição de tamanho medido por PCS medido para o sistema nanoparticulado: (a) nanopartículas de BSA com o FS; (b) nanopartículas polieletrólíticas de BSA com fotossensibilizador e uma camada de PAH; (c) nanopartículas polieletrólíticas de BSA com fotossensibilizador, uma camada de PAH e PSS.



Fonte: o autor.

A Figura 14 mostra a evolução temporal do tamanho e do potencial zeta para NPBSA-SiPc(OH)₂. As amostras foram mantidas no escuro. As análises foram realizadas em função do tempo por 90 dias em água ultra-pura.

Figura 14: Perfil hidrodinâmico de tamanho de partícula e potencial zeta da amostra de nanopartículas polieletrólíticas de BSA- SiPc(OH)₂ monitorada durante 90 dias após a preparação.



Fonte: o autor.

Um mínimo de ± 20 mV para o potencial zeta de nanopartículas preparadas é extremamente recomendado no caso da estabilização eletrostática e estérica combinada das nanopartículas (OZGUR *et al*, 2011).

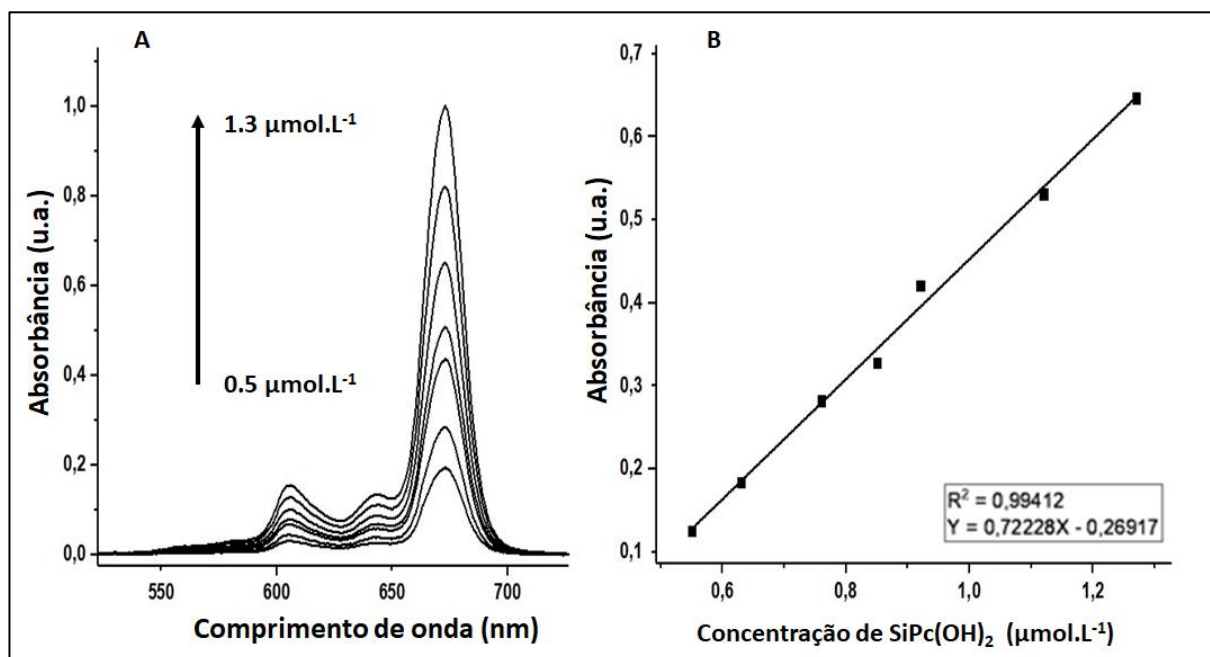
O potencial de superfície da partícula antes do carregamento do FS foi encontrado em -33,2 mV e após o carregamento do FS -33,4 mV. Esses dados sugerem que o fármaco está encapsulado nas nanopartículas porque o potencial zeta de NPBSA- SiPc(OH)₂ está próximo do potencial zeta de nanopartículas de BSA sem medicamento (CSABA; GARCIA-FUENTES; ALONSO, 2006), o que é desejável para uma nanossuspensão estável.

5.4 Espectroscopia de absorção uv-vis no estado estacionário

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de obter resultados de teste diretamente proporcionais à concentração do analito. As análises de regressão linear foram realizadas plotando a intensidade da absorbância *versus* a concentração do fármaco ($\mu\text{mol.L}^{-1}$) e foram determinadas por espectroscopia UV-Vis, registrando uma curva de calibração (Figura 15a). Linearidade satisfatória foi detectada pelo método espectrofotométrico na faixa de concentração de 0,5 a 1,3 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. A regressão pelo quadrado mínimo para o método espectrofotométrico mostrou excelente coeficiente de

correlação ($r = 0,999971$) e a equação linear foi: $\text{absorbância} = 0,72228x [\text{SiPc}(\text{OH})_2, \text{concentração em } \mu\text{mol.L}^{-1}] - 0,26917$ (Figura 15b).

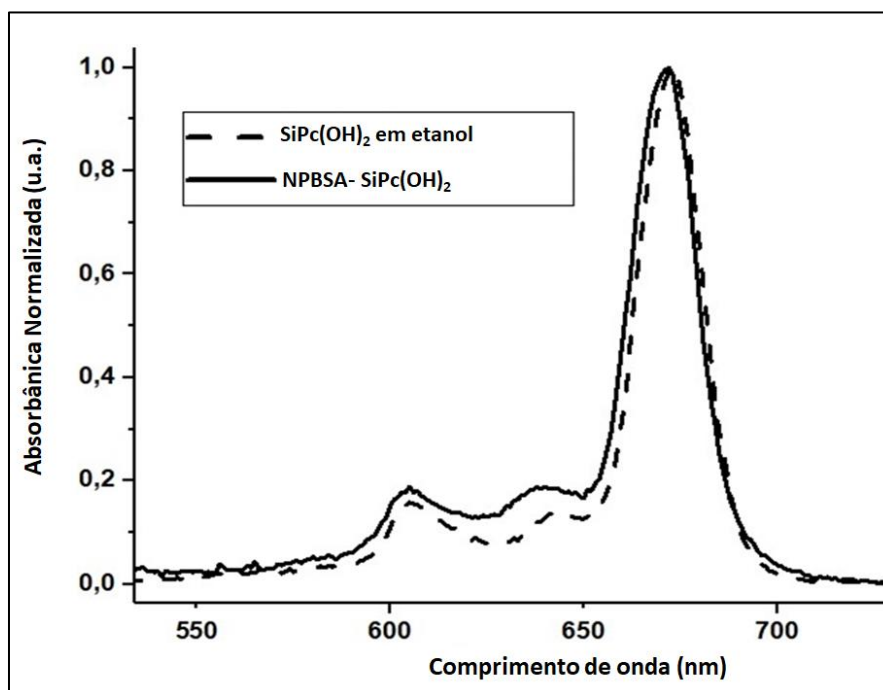
Figura 15: (a): Espectros de absorção de $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ em diferentes concentrações ($0,5 - 1,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$). (b): gráfico da concentração de $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ vs. absorbância.



Fonte: o autor.

Para baixas intensidades de absorção (baixas concentrações de ftalocianina, de $0,5$ a $1,3 \mu\text{mol.L}^{-1}$), foi observada uma relação linear. No entanto, para soluções mais concentradas (absorção máxima de $1,0$), foi verificada uma relação não linear, sugerindo uma agregação das partículas. As nanopartículas foram inicialmente caracterizadas no estado estacionário por espectroscopia de absorbância. Os espectros de absorção do padrão $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ ($1,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$) e extraídos das nanopartículas polieletrólíticas de BSA em etanol são ilustrados na Figura 16.

Figura 16: Espectros de absorção da $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) em etanol:(--) padrão $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ e (-) $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ extraído de nanopartículas polieletrólítica de BSA.



Fonte: o autor.

Foi observado um máximo da banda Q em 676 nm no sistema nanoparticulado, em que a penetração de luz na pele é máxima (650-850 nm, janela fototerapêutica), o que deve aumentar a eficiência dos danos celulares e da resposta do tumor ao fototratamento (CALIXTO *et al*, 2016).

Na TFD, comprimentos de onda mais curtos (<650 nm) têm menos penetração no tecido e são absorvidos pelas moléculas de hemoglobina do organismo, resultando em alta fotossensibilidade da pele. Por outro lado, as bandas de absorção com comprimentos de onda mais longos (> 850 nm), ocorre absorção da energia pelas moléculas de água presente no organismo, o que gera um efeito térmico (YOON; LI; SHIM, 2013). Portanto, o máximo de permeabilidade do tecido ocorre dentro da faixa de aproximadamente 650 a 850 nm.

A agregação de ftalocianinas hidrofóbicas, como $\text{SiPc}(\text{OH})_2$, pode ocorrer em ambiente aquoso, o que pode degradar o desempenho das moléculas em várias aplicações, devido à alteração de suas propriedades fotofísicas (MACHADO, 2000).

Os agregados em solução exibem alterações distintas na banda de absorção em comparação com as espécies monoméricas. Assim, se o fotossensibilizador $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ estiver presente no meio na forma de agregação de dímeros, poderíamos observar alterações no perfil

espectral do fármaco, o que não foi observado. Neste estudo, não houve mudança de banda na análise espectroscópica, na faixa de concentração estudada, sugerindo que o FS está no estado monomérico quando é encapsulado no sistema de liberação em estudo.

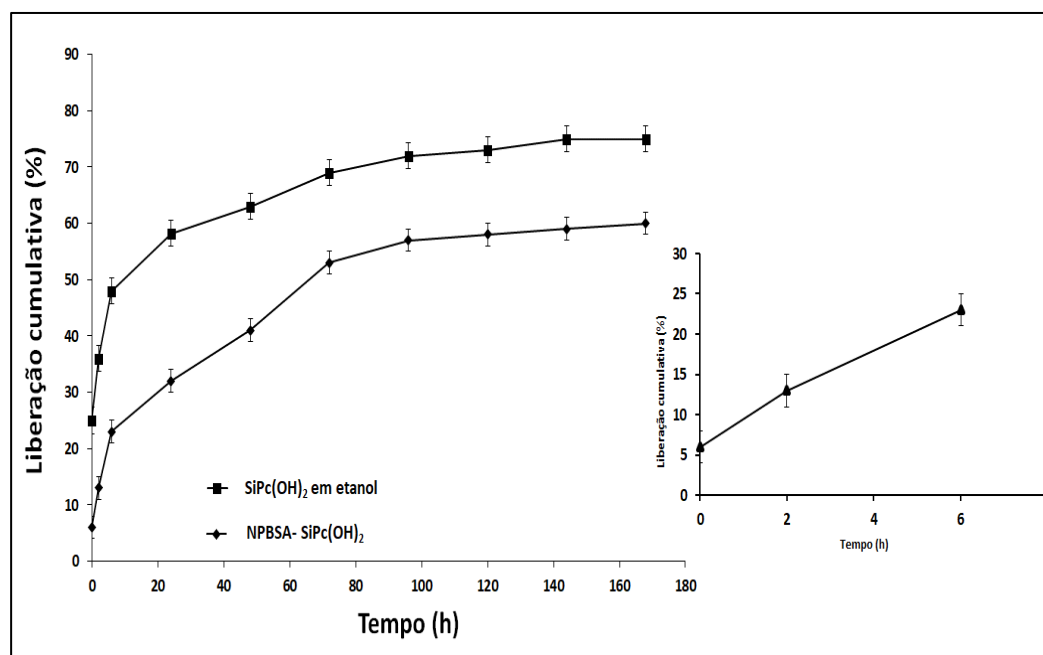
Foram obtidos rendimentos satisfatórios e eficiência de encapsulação das nanopartículas de SiPc(OH)₂ (rendimento = 73% ± 1,1 e EE = 79,0% ± 1,4). Sadeghi *et al* (2013) obtiveram uma eficiência de até 20,0% para o encapsulamento de curcumina em nanopartículas de BSA usando etanol como agente dessolvante.

Quando nanopartículas são produzidas na presença de compostos hidrofóbicos e insolúveis em água, como a SiPc(OH)₂, devido a baixa solubilidade em água, elas são atraídas umas pelas outras, resultando em uma eficiência de encapsulamento aumentada. O fotossensibilizador em estudo foi adequadamente encapsulado em nanopartículas com uma eficiência de encapsulamento de 79,0%. O aprisionamento de drogas hidrofóbicas, como SiPc(OH)₂, em nanopartículas polieletrólíticas de BSA pode ser explicado com base na localização preferencial da droga dentro do núcleo nanoparticulado, que é menos hidrofílico do que o ambiente aquoso externo (GONG *et al*, 2009).

5.5 Avaliação do desempenho de liberação do fármaco *in vitro*

A liberação *in vitro* da SiPc(OH)₂ encapsulada em nanopartículas polieletrólítica de BSA foi realizada sob condição de difusão (Figura 17). Para avaliar a liberação do FS *in vitro* a partir do método de difusão de nanopartículas polieletrólíticas de BSA, a concentração do FS foi quantificada por espectrometria a 676 nm usando uma curva de calibração.

Para reduzir a taxa de liberação e aliviar o *burst* inicial, PAH/PSS foram depositados alternadamente em nanopartículas de BSA através da técnica layer-by-layer. Este invólucro PAH/PSS consiste apenas de uma bicamada de policação/poliânion e não pode, ele próprio, representar um invólucro de barreira de difusão densa na superfície das nanopartículas. Provavelmente, a estrutura da barreira de difusão envolve uma interação mais profunda dos polieletrólitos com o núcleo de BSA, semelhante à formação da barreira protetora LbL em microcápsulas moles assistidas por PEG para entrega de insulina (SAVOLAINEN *et al*, 2008).

Figura 17: Perfil de liberação da $\text{SiPc}(\text{OH})_2$.

Fonte: o autor.

A análise do sistema nanoparticulado mostra um perfil de liberação para o FS encapsulado em nanopartículas polieletrólíticas de BSA com liberação de aproximadamente 23% nas primeiras 6 h, seguidos por uma liberação lenta ao longo de 7 dias. 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 50%.

A investigação de liberação de drogas *in vitro* constatou que a bicamada de polieletrólitos depositada por LbL é muito eficiente para reduzir a taxa de liberação e atenuar a explosão inicial de drogas carregadas em nanopartículas de BSA.

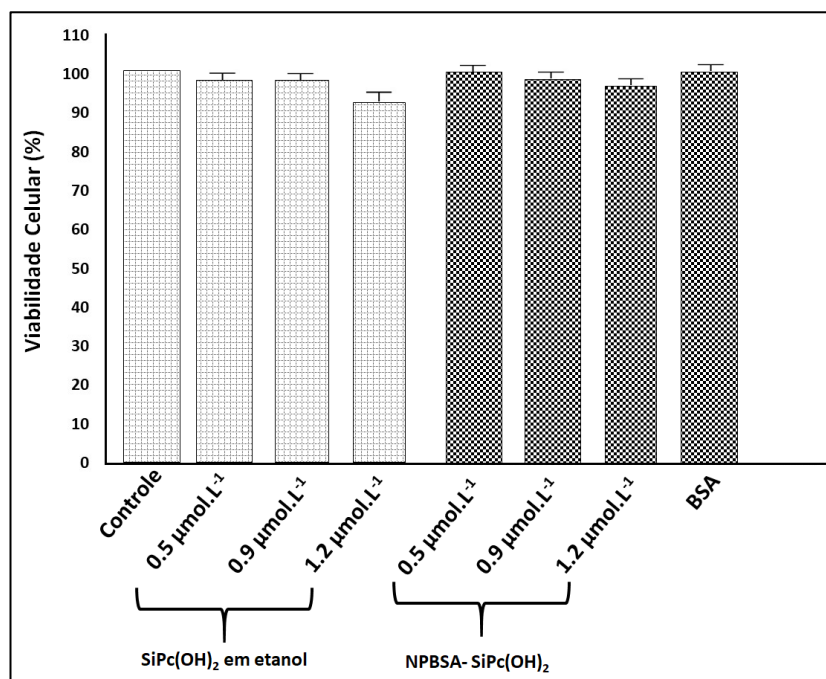
5.6 Ensaio de citotoxicidade de NPBSA- $\text{SiPc}(\text{OH})_2$

Uma característica de um FS ideal para aplicação em TFD é que ele deve possuir mínima toxicidade no escuro e ser citotóxico apenas na presença de luz no comprimento de onda definido (KWIATKOWSK *et al.*, 2018).

Os efeitos tóxicos *in vitro* no escuro das concentrações de NPBSA- $\text{SiPc}(\text{OH})_2$ de 0,5, 0,9 e 1,2 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ foram avaliados em linhagem celular de melanoma de camundongo B16-F10 (ATCC 6322).

Na Figura 18 são apresentadas as porcentagens de viabilidade celular após o ensaio de toxicidade no escuro. Após 3 h de incubação no escuro (37 °C, 5% de CO₂), não houve evidência de efeito tóxico das NPBSA- SiPc(OH)₂ nas células B-16 para qualquer uma das concentrações de SiPc(OH)₂ testadas.

Figura 18: Citotoxicidade de SiPc(OH)₂ em células B-16. As células foram incubadas variando as concentrações de NPBSA- SiPc(OH)₂ (0,50; 0,90 e 1,2 μmol.L⁻¹) e do FS em etanol por 3 h no escuro. Os dados são apresentados como média ± DP de três experimentos independentes; * p <0,05.



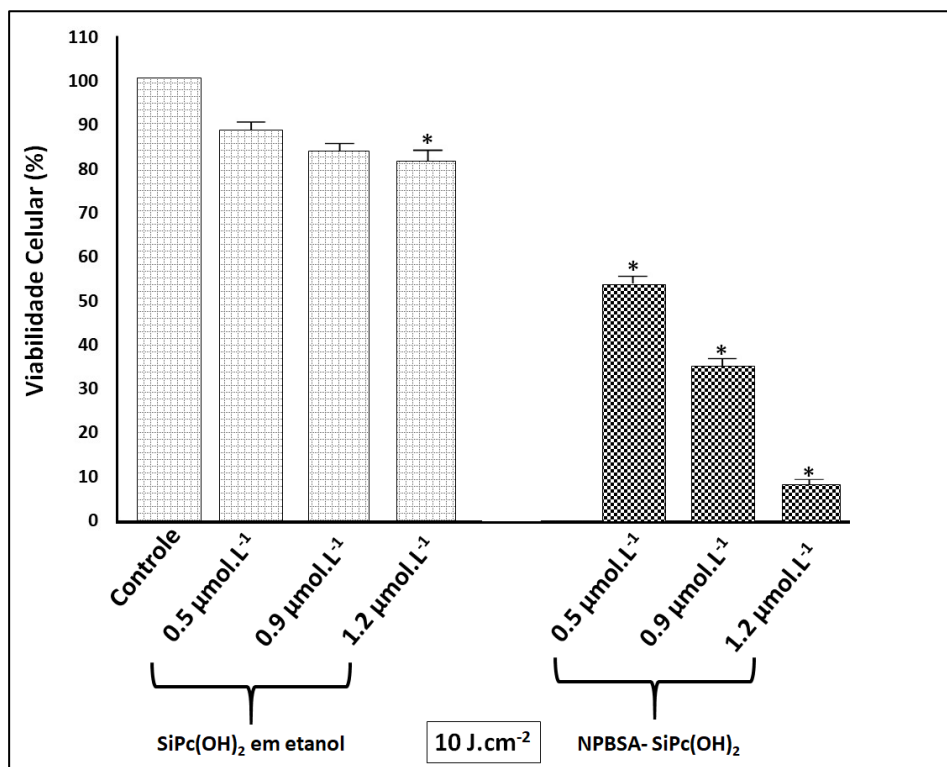
Fonte: o autor.

Como mostrado na Figura 18, não houve diferenças significativas entre a viabilidade de células expostas as nanopartículas e células não tratadas ($p > 0,05$), confirmando a biocompatibilidade das nanopartículas polieletrólíticas de BSA. Sem irradiação, quase 100% das células eram viáveis na faixa de concentração utilizada. Este resultado concorda com pesquisas anteriores que afirmam que as nanopartículas de proteínas podem ser biocompatíveis com tecidos e células quando sintetizadas a partir de materiais biocompatíveis ou biodegradáveis (DEFRADES *et al*, 2018).

5.7 Ensaio de fototoxicidade de NPBSA- SiPc(OH)₂

Os estudos de fototoxicidade *in vitro* mostraram que as nanopartículas polieletrólíticas de BSA carregadas com SiPc(OH)₂ são mais fototóxicas do que o SiPc(OH)₂ livre, como apresentado na Figura 19.

Figura 19: Fototoxicidade de SiPc(OH)₂ em células B-16.



Fonte: o autor.

A atividade fotobiológica é altamente dependente do mecanismo de captação celular do fotossensibilizador e de sua localização subcelular. Em meio aquoso, um fotossensibilizador lipofílico livre é geralmente absorvido por difusão através da membrana plasmática (lipofílica), levando a uma baixa concentração intracelular (DEFRATES *et al*, 2018; BENOVA, 2015).

Devido a sua biocompatibilidade com o sistema celular, NPBSA- SiPc(OH)₂ pode entrar na célula por endocitose, liberando o FS no citoplasma da célula, acumulando-se na membrana citoplasmática, no compartimento lisossômico e nas mitocôndrias (MARTINS *et al*, 2019).

A combinação de concentração do FS e a dose de radiação correspondente foram letais para células de melanoma. Young e colaboradores (2016) avaliaram o efeito de um fotossensibilizador clássico, a zinco ftalocianina (ZnPc), em linhagem celular de carcinoma cervical (HeLa). As células incubadas com ZnPc ($1 \mu\text{mol.L}^{-1}$) foram expostas à luz visível com dose de $43,2 \text{ J.cm}^{-2}$ com redução na viabilidade celular para $52,7 \pm 2,1 \%$.

As nanopartículas polieletrólíticas encapsuladas com a SiPc(OH)_2 , utilizadas neste trabalho, foram capazes de reduzir a viabilidade celular em torno de 90 % (concentração de $1,2 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e 10 J.cm^{-2}). Esse fator pode ser atribuído à maximização das propriedades espectroscópicas apresentadas pelo SiPc(OH)_2 nas nanopartículas polieletrólíticas de BSA, que potencializa a ação do fármaco necessário para atingir a resposta fotodinâmica.

6 CONCLUSÕES

As nanopartículas polieletrólíticas de BSA carregadas com a ftalocianina de silício di-hidróxido [SiPc(OH)₂], foram preparadas com sucesso pela técnica de dessolvatação em uma etapa seguido do recobrimento de filmes finos de polieletrólitos de cargas opostas, poli (cloridrato de alilamina - PAH) e poli (estireno sulfonato - PSS) utilizando a técnica de *layer-by-layer* e exibiu características fotofísicas e fotobiológicas favoráveis, como espectro UV-vis, distribuição de tamanho, PDI e potencial zeta. Pelo estudo de liberação de fármacos *in vitro* constatou que a bicamada de polieletrólitos depositada por LbL é muito eficiente para reduzir a taxa de liberação e atenuar o *burst* inicial de FS carregados em nanopartículas de BSA. O uso de formulações de nanopartículas polieletrólíticas de BSA em um ambiente biológico foi vantajoso porque o fotosensibilizador carregado nesse sistema de entrega foi mais eficaz que o fotosensibilizador em sua forma livre e maximizou a ação fotodinâmica *in vitro* levando a morte as células de melanoma murino utilizadas como modelo celular. Esses resultados reforçam a ideia de que o uso de nanopartículas polieletrólíticas de BSA como sistemas de administração de drogas hidrofóbicas é útil para protocolos de TFD.

REFERÊNCIAS

- AN, Q.; HUANG, T.; SHI, F. Covalent layer-by-layer films: chemistry, design, and multidisciplinary applications. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 13, p. 5061-5098, 2018.
- ARNEDO, A.; ESPUELAS, S.; IRACHE, J. M. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n.1-2, p. 59-72, 2002.
- AVCI, P.; ERDEM, S. S.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy: one step ahead with self-assembled nanoparticles. **Journal of biomedical nanotechnology**, v.10, n. 9, p. 1937-1952, 2014.
- BENOV, L. Photodynamic Therapy: Current Status and Future Directions. **Med Princ Pract**, v. 24, suppl. 1, p. 14-28, 2015.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.
- BRANNON-PEPPAS, L. **Polymers in Controlled Drug Delivery**. Chicago: CRC, 1997.
- CAIXETA, B. P. **Síntese e caracterização de fotossensibilizadores baseados em ftalocianinas de Zn(II) assimétricas tipo A3B**. 2018. 142f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2018.
- CALIXTO, G. *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. **Journal of Biomaterials Science**, v. 29, n. 11, p. 1287-1301, 2018.
- CHAPEL, J.-P. ; BERRET, J.-F. Montagem eletrostática versátil de nanopartículas e polieletrólitos: processos de revestimento, agrupamento e camada por camada. **Opinião atual em ciência de colóides e interfaces** , v. 17, n. 2, p. 97-105, 2012.
- CHEN, K. *et al.* Novel photosensitizer-protein nanoparticles for photodynamic therapy: photophysical characterization and in vitro investigations. **J Photochem Photobiol B, Biol.**, v. 96, n. 1, p. 66-74, 2009.
- CSABA, N.; GARCIA-FUENTES, M.; ALONSO, M. J. The performance of nanocarriers for transmucosal drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv**, v. 3, n. 4, p. 463-478, 2006.
- DEFRATES, K. *et al.* Protein polymer-based nanoparticles: fabrication and medical applications. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 6, 2018.
- DIMER, F. A. *et al.* Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. Química nova. São Paulo: **Sociedade Brasileira de Química**, v. 36, n. 10, p. 1520-1526, 2013.

- DREIS, S. *et al.* Preparation, characterization and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. **Int. J. Pharm**, v. 341, n. 1-2, p. 207-214, 2007.
- FERREIRA, C. H. **Desenvolvimento de biomateriais para liberação de fármacos a base de titânio e colágeno**. 2019. 64 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, 2019.
- GOMES, T. C. **Dispositivos MIS à base de Ftalocianina e óxido de alumínio produzidos por impressão jato de tinta em substrato flexível**. 2014. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Presidente Prudente, 2014.
- GONG, J. *et al.* Synthesis, characterization, drug-loading capacity and safety of novel octyl modified serum albumin micelles. **Int. J. Pharm**, v. 376, n. 1-2, p. 161-168, 2009.
- JAHANBAN-ESFAHLAN, A.; DASTMALCHI, S.; DAVARAN, S. A simple improved desolvation method for the rapid preparation of albumin nanoparticles. **Int. J. Biol. Macromol**, , v. 91, n. 1, p. 703-709, 2016.
- JAYME, C. C. **Estudo da utilização de filmes poliméricos a base de DNA como sistema carreador de fármacos e ativos**. 2018. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.
- KAWASE, N. *et al.* Estudo da estrutura e polimerização de filmes finos de SiPc (OH) 2 cultivados epitaxialmente por microscopia eletrônica de alta resolução. **Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics**, v. 31, n. 12, p. 1713-1723, 1993.
- KIM, D. *et al.* Layer-by-layer assembly-induced triboelectric nanogenerators with high and stable electric outputs in humid environments. **Nano energy**, v. 44, p. 228-239, 2018.
- KOLLURU, L. P. *et al.* Formulation development of albumin based theragnostic nanoparticles as a potential delivery system for tumor targeting. **J. Drug Target**, v. 21, n. 1, p. 77-86, 2013.
- KRATZ, F., Albumin as a drug carrier: design of prodrugs, drug conjugates and nanoparticles. **J. Control. Release** 132, 171–183, 2008.
- KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.
- LANGER, K. *et al.* Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles. **Int. J. Pharm**, v. 257, n. 1-2, p. 169-180, 2003.
- LI, C. *et al.* Preparation, and characterization of galactosylated bovine serum albumin nanoparticles for liver-targeted delivery of oridonin. **Int. J. Pharm**, v. 448, n. 1, p. 79-86, 2013.

LIMA, A. L. L. M.; OLIVEIRA, P. R. D. DE. Atualização em infecções em próteses articulares. **UPDATE ON INFECTIONS IN ARTICULAR PROSTHESIS**, v. 45, n. 6, p. 520–523, 2010.

LOPES, C. M; LOBO, J. M. S; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 2, p. 143-154, 2005.

MACHADO A. E. H. Terapia Fotodinâmica: Princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 23, n. 2, p. 237-243, 2000.

MACHADO, Aline Helena Araujo et al. Localização e citotoxicidade da Zinco Ftalocianina Octa-bromada em cultura de células CHO-K1. **IX Encontro Latino Americano de Iniciação Científica e V Encontro Latino Americano de Pós Graduação**, v. 1, p. 120-123, 2005.

MA-HAM, A.; WU, H.; WANG, J.; KANG, X.; ZHANG, Y.; LIN, Y. Apoferritin-based nanomedicine platform for drug delivery: equilibrium binding study of daunomycin with DNA, **Journal of Materials Chemistry**, v. 21, p. 8700-8708, 2011.

MARTINS, W. K. *et al.* Parallel damage in mitochondria and lysosomes is an efficient way to photoinduce cell death. **Autophagy**, v. 15, n. 2, p. 259-279, 2019.

MOHANTY, M. N.; SENAPATI, M. R. Application of Nanotechnology in Medical Science for Photodynamic Therapy. **IJECT**, v. 8, n. 4, p. 9-16, 2017.

OZGUR, A. *et al.* Synthesis and biological evaluation of radiolabeled photosensitizer linked bovine serum albumin nanoparticles as a tumor imaging agent. **Int. J. Pharm**, v. 422, n. 1-2, p. 472-478, 2011.

RAHIMNEJAD, M.; NAJAFPOUR, G.; BAKERI G. Investigation and modeling effective parameters influencing the size of BSA protein nanoparticles as colloidal carrier. **Colloid Surf. A**, v. 412, n. 20, p. 96-100, 2012.

RAMOS, R. R. **Terapia fotodinâmica**: estudo comparativa de luz led e laser sobre propionibacterium acnes in vitro. 2018. 47f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto, São José do Rio Preto, 2018.

RAO K, S. *et al.* Novel chitosan-based pH-sensitive interpenetrating network microgels for the controlled release of cefadroxil. **Carbohydr. Polym**, v. 66, n. 3, p. 333-344, 2006.

RICHARDSON, J. J.; BJÖRNMALM, M.; CARUSO, F. Technology-driven layer-by-layer assembly of nanofilms. **Science**, v. 348, n. 6233, 2015.

ROTELOK, D. **Síntese de novos materiais baseados em ftalocianinas para captura de CO₂**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em química) – Universidade de Coimbra, Coimbra, 2013.

SADASIVAM, M. *et al.* Self-assembled liposomal nanoparticles in photodynamic therapy. **European Journal of Nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 115-129, 2013.

SADEGHI, R. *et al.* The effect of different desolvating agents on BSA nanoparticle properties and encapsulation of curcumin. **Journal of nanoparticle research**, v. 16, n. 9, p. 1-14, 2014.

SAILAJA, A. K.; AMARESHWAR P. Preparation of BSA nanoparticles by desolvation technique using acetone as desolvating agent. **Int. J. Pharm. Sci. Nanotechnol**, v. 5, n. 1, p. 1643-1647, 2010.

SANTOS, C. C. *et al.* Terapia Fotodinâmica em pacientes HIV/Aids com doença periodontal e com resistência a HAART. **Brazilian Oral Research**[S.l: s.n.], 2018.

SAVOLAINEN, J. *et al.* Characterizing the functional dynamics of zinc phthalocyanine from femtoseconds to nanoseconds. **J Photoch. Photobio. A**, v. 196, p. 99-105, 2008.

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

SEBAK, S. *et al.* Human serum albumin nanoparticles as an efficient noscapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis. **Int. J. Nanomed**, v. 5, n. 1, p. 525-532, 2010.

SHUTAVA, T. G. *et al.* Layer-by-layer-coated gelatin nanoparticles as a vehicle for delivery of natural polyphenols. **ACS nano**, v. 3, n. 7, p. 1877-1885, 2009.

SILVA, E. P. O. **Estudos fotofísicos e fotobiológicos de sistemas de liberação contendo o fármaco fotossensível cloro-ftalocianina de alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica.** 2016. 66f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

SIMIONI, A. R. *et al.* Effect of Diode-Laser and AC Magnetic Field of Bovine Serum Albumin Nanospheres Loaded with Phthalocyanine and Magnetic Particles. **J. Nanosci. Nanotechnol**, v. 11, n. 4, p. 3604-3608, 2011.

SKRT, M. *et al.* Interactions of diferente polyphenols with bovine serum albumin using fluorescence quenching and molecular docking. **Food Chem**, v. 135, n. 4, p. 2418-2424, 2012.

SOPPIMATH, K. S. *et al.* Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. **Journal of controlled release**, v. 70, n. 1-2, p. 1-20, 2001.

THASSU, D.; PATHAK, Y.; DELEERS, M. Nanoparticulate drug-delivery systems: an overview. *In*: THASSU, D.; DELLERS, M; PATHAK, Y. V. **Nanoparticulate Drug Delivery Systems**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2007. p. 21-52.

WANG, F. *et al.* In situ coacervated microcapsules with filled polyelectrolytes and charge-controlled permeation for dye molecules. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 209, p. 957-966, 2008.

YASMIN, R. *et al.* Nanopartículas de gelatina: um potencial candidato para aplicações médicas. **Revisões de nanotecnologia**, v. 6, n. 2, p. 191-207, 2017.

YEDOMON, B.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3, p. 398-405, 2013.

YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clin. Endosc**, v. 46, n. 1, p. 7-23, 2013.

YOUNG, J. *et al.* Phototoxicity of ZnPc and AlPc against cancer cells, **Med Sci Monit Basic Res**, v. 22, p. 156-164, 2016.

ZHAO, D. *et al.* Preparation, characterization and in vitro targeted delivery of folate-decorated paclitaxel-loaded bovine serum albumin nanoparticles. **Int. J. Nanomed**, v. 5, n. 1, p. 669-677, 2010.