

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Lia Mallmann Mattiazzi

**MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO À BASE DE
MALTOHEPTAOSE CONTENDO FTALOCIANINA DE MAGNÉSIO
PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

**Santa Maria, RS
2022**

Lia Mallmann Mattiazzi

**MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO À BASE DE MALTOHEPTAOSE
CONTENDO FTALOCIANINA DE MAGNÉSIO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química – **Ênfase em Físico-Química**.

Orientador: Prof^o Dr. Marcos Antônio Villetti

Santa Maria, RS
2022

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Mattiazzi, Lia Mallmann

Micelas de copolímeros em bloco à base de maltoheptaose contendo ftalocianina de magnésio para aplicação em terapia fotodinâmica / Lia Mallmann Mattiazzi.- 2022.
110 p.; 30 cm

Orientador: Marcos Antonio Villetti

Coorientadores: Thiago Augusto de Lima Burgo, Leandro Barros da Silva

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Nanocarreadores 2. Ftalocianina de magnésio 3. Copolímeros em bloco 4. Maltoheptaose 5. Terapia fotodinâmica I. Villetti, Marcos Antonio II. Burgo, Thiago Augusto de Lima III. da Silva, Leandro Barros IV. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, LIA MALLMANN MATTIAZZI, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Dissertação) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

LIA MALLMANN MATTIAZZI

**MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO À BASE DE MALTOHEPTAOSE
CONTENDO FTALOCIANINA DE MAGNÉSIO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química – Ênfase em Físico-Química.

Aprovada em 15 de fevereiro de 2022:



**Marcos Antonio Villetti, Doutor (UFSM)
(Presidente/Orientador)**



**Irene Teresinha Santos Garcia, Pós doctor (UFRGS)
(por videoconferência)**



**Cristiane de Bona da Silva, Doutora (UFSM)
(por videoconferência)**

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

À minha família, pelo apoio incondicional. Vocês são os pilares para meu crescimento e a razão do meu caminhar.

Aos meus amigos, por todo carinho e compreensão. Gratidão por poder contar com vocês nos bons e maus momentos.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Química, por todas as experiências únicas.

À orientação do professor Marcos Antonio Villetti, por todo o conhecimento compartilhado.

À banca de defesa, por todas as considerações e críticas visando a melhoria do trabalho.

Ao professor Redouane Borsali, por ceder gentilmente os copolímeros em bloco a base de maltoheptaose utilizados ao longo da pesquisa.

Ao Laboratório de Espectroscopia e Polímeros, professora Carmen Luisa Kloster e queridos colegas, por todo acolhimento e amizade.

Aos colaboradores de outros laboratórios, pela solicitude e parceria para realização de análises.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa concedida e pelo fomento à pesquisa realizada.

RESUMO

MICELAS DE COPOLÍMEROS EM BLOCO À BASE DE MALTOHEPTAOSE CONTENDO FTALOCIANINA DE MAGNÉSIO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

AUTORA: Lia Mallmann Mattiazzi

ORIENTADOR: Marcos Antonio Villetti

O desenvolvimento de novos nanocarreadores para os chamados fotossensibilizadores (FS) de terceira geração vêm contribuindo significativamente para a evolução da terapia fotodinâmica (TFD). Por apresentar máxima absorção em comprimento de onda dentro do intervalo da janela fototerapêutica (600-800 nm), baixa degradação fotoquímica e adequado rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}), a ftalocianina de magnésio (MgPc) é considerada um FS promissor para utilização em TFD. Entretanto, sua alta hidrofobicidade e a formação de agregados diminuem sua atividade fotodinâmica em meio fisiológico. Assim, a encapsulação da MgPc em nanoestruturas torna-se necessária, a fim de melhorar sua biodisponibilidade e aumentar a sua atividade fototerapêutica. A partir dessas considerações, o principal objetivo deste trabalho é encapsular a MgPc em micelas poliméricas obtidas a partir de copolímeros em bloco baseados em maltoheptaose (MH) e avaliar a sua atividade fotodinâmica. A título de comparação também foi realizada a encapsulação da MgPc em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona (PCL). A caracterização físico-química dos sistemas nanoestruturados (MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc) foi realizada através da determinação dos valores de diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, teor total de MgPc, eficiência de encapsulamento e estabilidade física ao longo do tempo utilizando o equipamento LUMiSizer. A atividade fotodinâmica das nanopartículas foi avaliada a partir do monitoramento da reação de degradação fotoquímica do supressor químico 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF). Também foram avaliados o perfil cinético de liberação *in vitro* da MgPc a partir das nanoestruturas, e a toxicidade e biodistribuição dos nanocarreadores frente aos nematódeos *Caenorhabditis elegans*. As nanoestruturas apresentaram tamanhos nanométricos, baixos índices de polidispersão (que confirmam a homogeneidade dos sistemas), potencial zeta negativo com altos valores em módulo e eficiência de encapsulamento acima de 95%. A análise por LUMiSizer revelou que as micelas poliméricas são altamente estáveis em meio aquoso, com estabilidade física estimada em três anos. Avaliando a atividade fotodinâmica das nanopartículas, concluiu-se que as micelas poliméricas contendo FS são capazes de gerar oxigênio singleto em níveis satisfatórios para o emprego em TFD, com valores de Φ_{Δ} próximos aos da MgPc não encapsulada. As nanoestruturas apresentam perfil sustentado de liberação do FS, com cinética de modelo biexponencial. O estudo de toxicidade demonstrou que as nanopartículas causam uma pequena redução do desenvolvimento larval dos *C. elegans*, mas não induzem letalidade quando os vermes são expostos a baixas concentrações, e que as mesmas estão majoritariamente distribuídas em células intestinais. Considerando estes resultados conclui-se que os sistemas nanoestruturados baseados em maltoheptaose são carreadores promissores para a MgPc, com potencial emprego na TFD.

Palavras-Chave: Nanocarreadores. Ftalocianina de magnésio. Copolímeros em bloco. Maltoheptaose. Terapia Fotodinâmica.

ABSTRACT

MALTOHEPTAOSE-BASED BLOCK COPOLYMER MICELLES CONTAINING MAGNESIUM PHTHALOCYANINE FOR APPLICATION IN PHOTODYNAMIC THERAPY

AUTHOR: Lia Mallmann Mattiazzi

ADVISOR: Marcos Antonio Villetti

The development of new nanocarriers for the so-called third-generation photosensitizers (FS) has contributed significantly to the evolution of photodynamic therapy (PDT). Due to its maximum absorption at wavelengths within the phototherapeutic window range (600-800 nm), low photochemical degradation, and adequate singlet oxygen quantum yield (Φ_{Δ}), magnesium phthalocyanine (MgPc) is considered a promising FS for use in PDT. However, its high hydrophobicity and formation of aggregates decrease its photodynamic activity in a physiological environment. Thus, the encapsulation of MgPc in nanostructures becomes necessary to improve its bioavailability and increase its phototherapeutic activity. From these considerations, the main objective of this work is to encapsulate MgPc in polymeric micelles obtained from block copolymers based on maltoheptaose (MH) and evaluate its photodynamic activity. By way of comparison, the encapsulation of MgPc in poly- ϵ -caprolactone (PCL) nanocapsules was also performed. The physicochemical characterization of the nanostructured systems (MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc, and PCL@MgPc) was carried out by determining the values of hydrodynamic diameter, polydispersion index, zeta potential, the total content of MgPc, encapsulation efficiency and physical stability over time by LUMiSizer. The photodynamic activity of the nanoparticles was evaluated by monitoring the photochemical degradation reaction of the chemical suppressor 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF). The kinetic profile of in vitro release of MgPc from the nanostructures and the toxicity and biodistribution of the nanocarriers against the nematodes *Caenorhabditis elegans* were also evaluated. The nanostructures presented nanometric sizes, low polydispersion indices (which confirm the homogeneity of the systems), negative zeta potential with high modulus values, and encapsulation efficiency above 95%. Analysis by LUMiSizer revealed that the polymeric micelles are highly stable in aqueous medium, with an estimated physical stability of three years. Evaluating the photodynamic activity of the nanoparticles it was concluded that polymeric micelles containing FS are capable of generating singlet oxygen at satisfactory levels for use in PDT, with Φ_{Δ} values close to those of unencapsulated MgPc. The nanostructures present a sustained FS release profile, with biexponential model kinetics. The toxicity study showed that the nanoparticles cause a small reduction in the larval development of *C. elegans*, but do not induce lethality when the worms are exposed to low concentrations, and that they are mostly located in intestinal cells. Considering these results, it is concluded that nanostructured systems based on maltoheptaose are promising carriers for MgPc, with potential use in PDT.

Keywords: Nanocarriers. Magnesium phthalocyanine. Block copolymers. Maltoheptaose. Photodynamic therapy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Profundidade de penetração da luz em tecidos biológicos para diferentes faixas de comprimento de onda.....	31
FIGURA 2 – Diagrama de Jablonski.....	32
FIGURA 3 – Estrutura molecular das ftalocianinas.....	35
FIGURA 4 – Representação das interações do tipo empilhamento π - π nas metaloftalocianinas.....	35
FIGURA 5 – Estrutura molecular da metaloftalocianina MgPc.....	36
FIGURA 6 – Número de publicações entre 2010 e 2021 contendo os termos <i>magnesium phthalocyanine</i> e <i>magnesium phthalocyanine nanoparticles</i>	39
FIGURA 7 – Aspecto visual das formulações de nanocarreadores em meio aquoso MH-b-PS@MgPc (NPA), MH-b-PMMA@MgPc (NPB) e PCL@MgPc (NPC).....	58
FIGURA 8 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para MH-b-PS@MgPc em meio aquoso.....	59
FIGURA 9 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para MH-b-PMMA@MgPc em meio aquoso.....	59
FIGURA 10 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para PCL@MgPc em meio aquoso.....	59
FIGURA 11 – Porcentagem de luz transmitida em função do tempo, a 25 °C, para as nanopartículas dispersas em meio aquoso (a) MH-b-PS@MgPc, (b) MH-b-PMMA@MgPc e (c) PCL@MgPc.....	65
FIGURA 12 – Aspecto visual das nanopartículas dispersas em meio aquoso (a) MH-b-PS@MgPc, (b) MH-b-PMMA@MgPc e (c) PCL@MgPc após a centrifugação por LUMiSizer na temperatura de 25 °C.....	66

FIGURA 13 – (a) Índice de instabilidade e (b) Índice de instabilidade em função do tempo para as nanopartículas dispersas em meio aquoso MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc, na temperatura de 25 °C.....	66
FIGURA 14 – Imagens de AFM para as nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc e (b) MH-b-PMMA@MgPc.....	68
FIGURA 15 – Fotodegradação do DPBF provocada pelo $^1\text{O}_2$	70
FIGURA 16 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPA branca. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.....	71
FIGURA 17 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPB branca. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.....	71
FIGURA 18 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPC branca. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.....	71
FIGURA 19 – Fotodegradação do DPBF pelo $^1\text{O}_2$ gerado pela MgPc livre. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.....	72
FIGURA 20 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula MH-B-PS@MgPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação fotoquímica do DPBF. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.....	75
FIGURA 21 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula MH-B-PMMA@MgPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação fotoquímica do DPBF. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.....	75
FIGURA 22 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula PCL@MgPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação fotoquímica do DPBF. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.....	76
FIGURA 23 – Perfil de liberação com fit biexponencial para MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc na temperatura de 37 °C.....	78

- FIGURA 24 – Taxa de sobrevivência de vermes N2 expostos a diferentes volumes das nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc e MH-b-PS@branca, (b) MH-b-PMMA@MgPc e MH-b-PMMA@branca, e (c) PCL@MgPc e PCL@branca durante 1 hora.....80
- FIGURA 25 – Comprimento dos animais após 48 h de exposição às nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc e MH-b-PS@branca, (b) MH-b-PMMA@MgPc e MH-b-PMMA@branca, e (c) PCL@MgPc e PCL@branca.....82
- FIGURA 26 – Imagens representativas do comprimento dos nematódeos após 48 h de exposição às nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc, (b) MH-b-PS@branca, (c) MH-b-PMMA@MgPc, (d) MH-b-PMMA@branca, (e) PCL@MgPc e (f) PCL@branca.....83
- FIGURA 27 – Imagens de microscopia confocal de fluorescência vermelha indicando a biodistribuição das NPs em vermes expostos durante uma hora às amostras de (a) controle, (b) MH-b-PS@MgPc, (c) MH-b-PMMA@MgPc ou (d) PCL@MgPc.....85

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Modelos matemáticos utilizados para analisar o perfil de liberação da MgPc nas nanopartículas	52
TABELA 2 – Resultados das análises de espalhamento de luz e potencial zeta para as nanopartículas	60
TABELA 3 – Dados de eficiência de encapsulamento (EE%) e concentração total de fármaco para os nanocarreadores	63
TABELA 4 – Constante de fotodegradação do DPBF (k), coeficiente de determinação (R^2) e rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para PS livre e encapsulados	76
TABELA 5 – Constante cinética (k) e coeficiente de determinação (R^2) resultantes da aplicação do modelo biexponencial para os dados de liberação dos sistemas MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc	79
TABELA 6 – Letalidade (%) em função do volume utilizado das nanopartículas contendo ou não MgPc. Valores destacados indicam letalidade significativa.....	81
TABELA 7 – Redução do crescimento dos vermes (%) em função do volume utilizado de nanopartículas contendo ou não MgPc. Valores em destaque indicam redução de crescimento significativa	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

λ	Comprimento de onda
ξ	Potencial zeta
ϕ_{Δ}	Rendimento quântico de oxigênio singlete
A	Absorbância
AFM	Microscopia de força atômica
AICIPc	Ftalocianina de cloro alumínio
ANOVA	Análise de variância
CMC	Concentração micelar crítica
CMQ	Carboximetilquitosana
CPB	Copolímero em bloco
D_h	Diâmetro hidrodinâmico
DLS	Dynamic light scattering
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPBF	1,3-difenilisobenzofurano
EE	Eficiência de encapsulamento
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Fc	Ftalocianina
FL	MgPc livre
FS	Fotossensibilizador
FT	MgPc total
HpD	Hematoporfirina
I(q)	Intensidade de luz espalhada
LoD	Limite de detecção
LoQ	Limite de quantificação
MH-b-PMMA	Maltoheptaose-bloco-polimetilmetacrilato
MH-b-PI	Maltoheptaose-bloco-poliisopreno
MH-b-PS	Maltoheptaose-bloco-poliestireno
MgPc	Ftalocianina de magnésio
MFc	Metaloftalocianina
m/m	Proporção massa - massa

mV	Milivolts
NP	Nanopartícula
$^3\text{O}_2$	Oxigênio molecular
$^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
PCL	Poli- ϵ -caprolactona
PLA	Ácido polilático
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
PDI	Índice de polidispersão
pH	Potencial Hidrogenionico
R^2	Coeficiente de determinação
R_h	Raio hidrodinâmico
S_0	Estado singleto fundamental
S_1^*	Estado singleto excitado
Span [®] 60	Monoestearato de sorbitano 60
T_1^*	Estado tripleto excitado
TCM	Triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico
TFD	Terapia fotodinâmica
TFT	Terapia fototérmica
THF	Tetraidrofurano
TT	Teor total de MgPc
TWEEN [®] 80	Polisorbato 80
xg	Força g
ZnPc	Ftalocianina de Zinco

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	24
2	OBJETIVOS	28
2.1	OBJETIVO GERAL	28
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	30
3.1	TERAPIA FOTODINÂMICA	30
3.1.1	Fotossensibilizadores	33
3.2	NANOESTRUTURAS CARREADORAS	37
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1	REAGENTES	44
4.2	PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS	44
4.2.1	Formulação A: nanopartículas de maltoheptaose-<i>b</i>-poliestireno (MH-<i>b</i>-PS@MgPc)	45
4.2.2	Formulação B: nanopartículas de maltoheptaose-<i>b</i>-polimetilmetacrilato (MH-<i>b</i>-PMMA@MgPc)	45
4.2.3	Formulação C: nanopartículas de poli(ϵ-caprolactona) (PCL@MgPc) ...	46
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	46
4.3.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta	47
4.3.2	Eficiência de encapsulamento e teor total de MgPc	47
4.3.3	Estabilidade física dos nanocarreadores	49
4.3.4	Avaliação morfológica das nanopartículas	49
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA	50
4.5	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	51
4.6	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	52
4.7	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	53
4.7.1	Nematódeos: cultura e tratamento	53
4.7.2	Exposição às nanopartículas	53
4.7.3	Análise do desenvolvimento larval	54
4.7.4	Mapeamento das nanopartículas <i>in vivo</i>	54
4.7.5	Análise estatística	54

5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA	56
5.1.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta	58
5.1.2	Eficiência de encapsulamento e teor total de MgPc	62
5.1.3	Estabilidade física dos nanocarreadores	63
5.1.4	Avaliação morfológica das nanopartículas	67
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA	69
5.3	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	77
5.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	80
5.4.1	Ensaio de taxa de sobrevivência	80
5.4.2	Ensaio de desenvolvimento larval	81
5.4.3	Mapeamento das nanopartículas <i>in vivo</i>	84
6	CONCLUSÕES	86
	REFERÊNCIAS	88
	APÊNDICE A – ESPECTROS DE DLS E POTENCIAL ZETA PARA AS NANOPARTÍCULAS BRANCAS	96
	APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO E TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO	98
	APÊNDICE C – TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE FOTODEGRADAÇÃO DO DPBF	100
	APÊNDICE D – CURVA DE CALIBRAÇÃO E TRIPLICATA DA ANÁLISE DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	108

1 INTRODUÇÃO

Desde o surgimento do universo, a luz desempenha um papel central na manutenção da vida em nosso planeta. Para os seres humanos, a presença de luz sempre foi muito associada à proteção e saúde. A adoração ao sol e seus deuses, banhos e outros rituais de povos antigos foram o princípio da relação da luz com a prevenção e tratamento de doenças. Com o passar dos séculos, fomos compreendendo melhor a sua natureza e, somente no final do século XIX, foram constatadas relações diretas entre morte celular e a luz, iniciando assim sua aplicação médica (MCDONAGH, 2001).

Em 1877, Downes e Blunt demonstraram a letalidade de raios ultravioleta, denominados “componentes actínicos” da luz, em microorganismos e bactérias. Já Raab, em 1900, comprovou a toxicidade de substâncias quando expostas à luz. Ao realizar experimentos, durante uma tempestade, com protozoários e acridina ($C_{13}H_9N$), um composto orgânico heterocíclico de nitrogênio, Raab acabou por constatar um aumento na toxicidade do composto. Ao reproduzir os experimentos pôde-se comprovar a maior eficácia da combinação acridina e luz quando comparado à acridina e luz aplicadas individualmente. Raab explicou os resultados utilizando como base a propriedade fluorescente deste corante orgânico, e afirmou que havia uma troca de energia entre a luz e a acridina (ACKROYD et al, 2001).

Foi um laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina, Niels Ryberg Finsen, em 1903, quem aplicou pela primeira vez a fototerapia a nível clínico, utilizando luz vermelha no tratamento de varíola. Manipulando filtros e lentes de quartzo, Finsen foi capaz de filtrar a luz solar e direcioná-la às lesões de interesse (FINSEN, 1903).

A partir dessas descobertas, então, Hermann von Tappeiner, em 1904, cunhou o termo “ação fotodinâmica”. Essa se refere a reações entre um fotossensibilizador (FS) e a luz, na presença de oxigênio molecular (3O_2) (DIAS et al, 2020).

Mais tarde, em 1907, o termo terapia fotodinâmica (TFD) surgiu para melhor descrever o método de tratamento baseado na geração do citotóxico oxigênio

singleto ($^1\text{O}_2$) e espécies reativas de oxigênio (EROs) através da interação entre um FS e fótons de uma fonte de luz com comprimentos de onda específicos (λ), na presença de $^3\text{O}_2$ (DANIELL e HILL, 1991). O λ utilizado na TFD varia de acordo com o FS, uma vez que tem relação com sua banda de absorção, no entanto indica-se estar entre 630 e 850 nm, intervalo da chamada “janela fototerapêutica” (DĄBROWSKI, 2017).

Depois de geradas, as EROs causam estresse oxidativo, promovendo morte celular direta ou através do dano a estruturas celulares, como a oclusão vascular. A erradicação das células de interesse ainda pode ser acompanhada da indução de reações inflamatórias locais e desenvolvimento de imunidade antitumoral sistêmica, uma espécie de “memória” antitumoral a longo prazo (DĄBROWSKI, 2017).

Parte essencial para o sucesso da TFD também é a escolha do fotossensibilizador. Um bom FS deve ser biologicamente estável, apresentar baixa toxicidade e retenção seletiva no organismo, além de possuir alta capacidade de gerar $^1\text{O}_2$ e não ser citotóxico na presença de luz natural (ALLISON et al, 2004; YANO et al, 2011).

Uma das famílias de FS mais utilizadas na TFD é a das ftalocianinas (Fc), moléculas orgânicas sintéticas, quimicamente estáveis, similares às porfirinas. Elas possuem propriedades foto e semicondutoras, reatividade fotoquímica e ampla aplicabilidade bio-orgânica e tecnológica (EL-KHOULY et al, 2004).

Devido à sua estrutura eletrônica, as Fc possuem bandas de absorção na região do vermelho (dentro da janela fototerapêutica) e apresentam alta absorvidade molar, o que as torna apropriados FS. Sua baixa absorção entre 300 e 600 nm (bandas B ou *soret*) também é um ponto positivo, pois diminui a citotoxicidade por exposição à luz visível, um efeito colateral de muitos FS já conhecidos (DĄBROWSKI et al, 2016; DE SOUZA et al, 2016).

Muitos FS trazem consigo um desafio atrelado à sua natureza: baixa solubilidade e tendência de formar dímeros e agregados em meio aquoso. Essas propriedades interferem na biodisponibilidade do FS, e diminuem seu desempenho de atividade fotoquímica (RAK et al, 2019).

Em busca de suprimir essas características, é cada vez mais comum a encapsulação e conjugação de FS utilizando polímeros. Essa combinação vem permitindo a proteção dessas substâncias em ambientes críticos, e também o acúmulo seletivo e liberação controlada no organismo, o que aumenta a biodisponibilidade do FS, tornando possível uma diminuição de dosagem (BAMRUNGSAP et al, 2012).

Os polímeros utilizados para produção de nanopartículas (NP) podem ser de origem natural ou sintética. São exemplos comuns de polímeros sintéticos aplicados em nanoestruturas o ácido polilático (PLA), ácido poliglicólico (PGA), poli(ϵ -caprolactona) (PCL), etil celulose e quitosana e seus derivados. Já alginato, dextrana, amido e pectina (polissacarídeos), caseína e gelatina (proteínas) são exemplos de macromoléculas extraídas de fontes naturais (RAK et al, 2019).

Outra possibilidade na formulação de NPs é o uso de copolímeros em bloco (CPB), obtidos a partir do arranjo de dois ou mais blocos poliméricos, como por exemplo a maltoheptaose-bloco-poliestireno (MH-b-PS) (OTSUKA et al, 2013), a maltoheptaose-bloco-polimetilmetacrilato (MH-b-PMMA) (ZEPON et al, 2015; ZEPON et al, 2016) e maltoheptaose-bloco-poliisopreno (MH-b-PI) (CALDAS et al, 2020). As nanoestruturas resultantes do processo de auto-organização controlado de CPB são micelas poliméricas nanométricas, que encapsulam diferentes tipos de substâncias majoritariamente hidrofóbicas (OTSUKA et al, 2013).

Apesar dos já citados benefícios da encapsulação de FS, e do uso crescente de CPB baseados em açúcares naturais, como é o caso da MH-b-PS e MH-b-PMMA, são poucos os trabalhos disponíveis na literatura que fazem a associação dessas substâncias. Com base nessas informações, o presente trabalho avaliou o efeito da encapsulação em meio aquoso de ftalocianina de magnésio (MgPc) em três diferentes sistemas nanoestruturados, utilizando os copolímeros em bloco MH-b-PS e MH-b-PMMA e, a título de comparação, o polímero poli- ϵ -caprolactona. Foram avaliadas as características físico-químicas das NP, como diâmetro hidrodinâmico (Dh), potencial zeta (ξ), índice de polidispersão (PDI), eficiência de encapsulamento (EE) e teor total de MgPc (TT). Além disso, foram determinadas a estabilidade física das formulações em meio aquoso, o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}), o perfil cinético de liberação *in vitro* do FS e a citotoxicidade frente à *Caenorhabditis elegans*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Encapsular o composto ftalocianina de magnésio (MgPc) em nanopartículas de copolímeros em bloco baseados em maltoheptaose, caracterizar e avaliar suas propriedades físico-químicas, atividade fotodinâmica, cinética de liberação e toxicidade visando seu emprego em terapia fotodinâmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e obter formulações termodinamicamente estáveis de nanopartículas utilizando os copolímeros em bloco MH-b-PS e MH-b-PMMA contendo MgPc, em meio aquoso. A título de comparação o composto será encapsulado em NPs de PCL, visando verificar as diferenças entre os sistemas nanoestruturados (micela e nanocápsula polimérica);
- Caracterizar as nanopartículas de acordo com seu tamanho, índice de polidispersão e potencial zeta;
- Determinar a eficiência de encapsulamento e o teor total de MgPc das nanopartículas;
- Avaliar a atividade fotodinâmica através da determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto da MgPc livre e encapsulada, pela fotodegradação do supressor químico 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) em dimetilsulfóxido (DMSO);
- Determinar a cinética de liberação *in vitro* das formulações de nanocarreadores contendo MgPc utilizando o método do saco de diálise;
- Avaliar a estabilidade e o tempo de prateleira das formulações de nanocarreadores utilizando o equipamento LUMiSizer.

- Avaliar a toxicidade das formulações de nanopartículas através de ensaios de taxa de sobrevivência e desenvolvimento larval de *Caenorhabditis elegans*.
- Avaliar a biodistribuição das nanopartículas em nematódeos *Caenorhabditis elegans* através da técnica de microscopia confocal.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

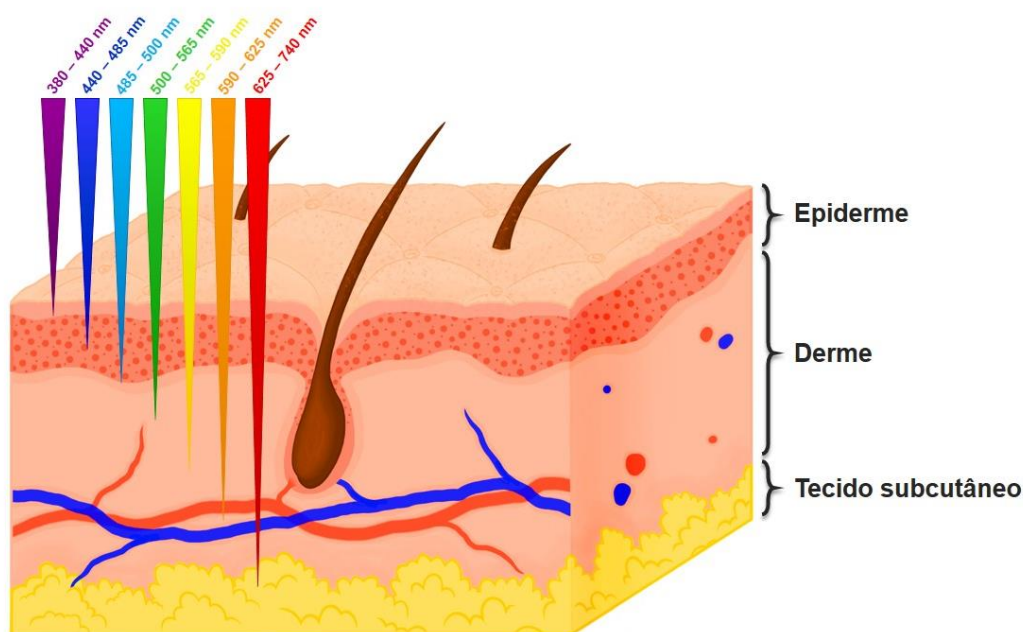
A Terapia Fotodinâmica (TFD) é relatada na literatura como um método alternativo e minimamente invasivo para o tratamento de doenças oncológicas e não oncológicas (YANO et al, 2011; MASTER et al, 2012). Atualmente a TFD é aplicada em nível mundial para tratamento clínico de doenças como câncer de pulmão em estágios iniciais e avançados (DOUGHERTY, 1983), câncer de bexiga (RAILKAR e AGARWAL, 2018), melanoma (SHAO et al, 2021; ZHONG et al, 2021), câncer gastrointestinal (KIM e PARK, 2010), e também na medicina estética combatendo a degeneração relacionada à idade (RAK et al, 2019). Por fazer uso de fontes de luz não ionizantes, a TFD apresenta vantagem em relação a métodos clássicos como a radioterapia. Além disso, o acúmulo seletivo do FS, juntamente da irradiação localizada em células e tecidos doentes, conferem ao tratamento menos efeitos colaterais e menor toxicidade em tecidos saudáveis (LIM et al, 2013; MASTER et al, 2012).

A base para o tratamento com TFD é a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são citotóxicos capazes de causar necrose e apoptose, levando à morte celular (SHANMUGAPRIYA e KANG, 2019). O mecanismo para geração dessas espécies envolve (i) a administração de uma substância fotossensível seguida de um tempo de espera para a máxima diferenciação entre células normais e doentes; e (ii) a irradiação da área de interesse com uma fonte de luz que emita fótons na região do visível ou infravermelho próximo causando a destruição do tecido anormal (BONNETT e MARTÍNEZ, 2001).

Os valores de λ do feixe de luz utilizado na TFD são baseados na interação da luz com os tecidos. Em λ menores que 630 nm os fótons são absorvidos por substâncias endógenas fluoróforas, como hemoglobina e melanina, ao passo que em λ maiores que 850 nm efeitos térmicos e o alto espalhamento de luz causado pelos tecidos geram uma limitação na penetrabilidade dos fótons (DĄBROWSKI, 2017). Indica-se então que sejam utilizadas na TFD fontes de luz com λ entre 650

and 850 nm, intervalo da chamada “janela fototerapêutica”, onde ocorre uma penetração mais efetiva da luz nos tecidos (Figura 1). Faz-se necessária também a escolha de um FS que possua absorção máxima nesse intervalo de comprimentos de onda, para que o efeito fotodinâmico seja intensificado (SHANMUGAPRIYA e KANG, 2019).

Figura 1 – Profundidade de penetração da luz em tecidos biológicos para diferentes faixas de comprimento de onda.

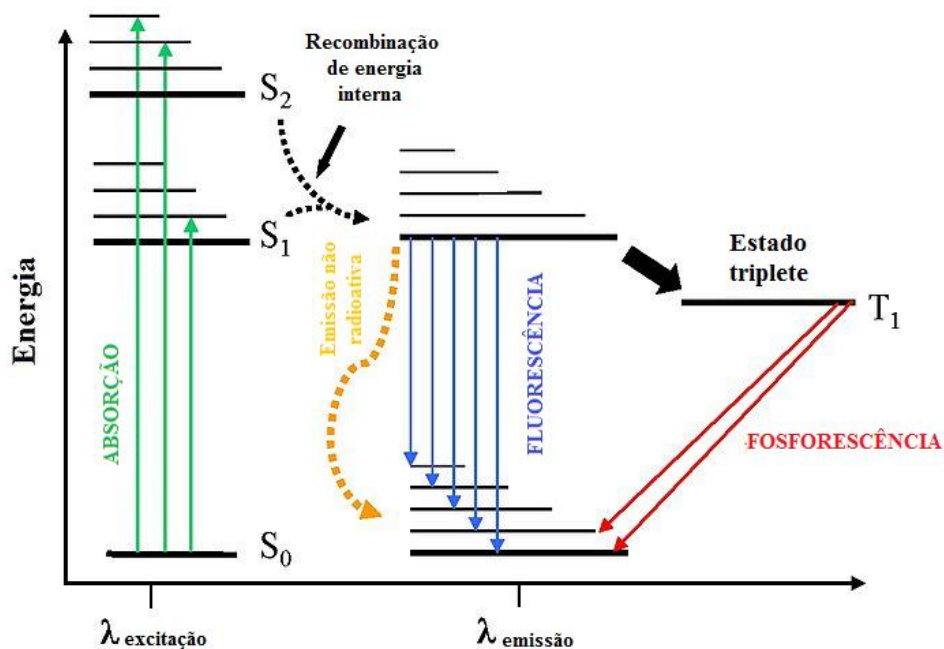


Fonte: Própria autora.

Como demonstrado pelo diagrama de Jablonski (Figura 2), ao absorver fótons provenientes de uma fonte de luz com comprimento de onda específico, o FS passa do estado fundamental (S_0) para o estado singleto excitado (S_1^*), que é altamente instável. A molécula de FS no estado S_1^* pode liberar a energia absorvida de três formas diferentes: por fluorescência, conversão interna ou por um cruzamento intersistema através do acoplamento spin-órbita. Processos de fluorescência e conversão interna não são os caminhos desejados na TFD, mas se provam úteis, por exemplo, na detecção e mapeamento de tumores (KATA et al, 2016). No caso

de liberação de energia por cruzamento intersistema, o FS passa ao estado excitado tripleto (T_1^*), que tem meia-vida de microssegundos. Esse intervalo de tempo é suficiente para o FS interagir com as moléculas disponíveis no meio e voltar ao estado fundamental transferindo seus elétrons ou energia para substratos orgânicos em reações do Tipo I e II respectivamente (MFOUO-TYNGA et al, 2021).

Figura 2 – Diagrama de Jablonski.



Fonte: traduzido de Wikimedia Commons (Disponível em: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Diagramme_de_Jablonski-EU.jpg)

A reação que envolve a transferência de elétrons (Tipo I) leva à formação de EROs como radicais catiônicos e aniônicos, radicais hidroxil, peróxil e superóxidos. Já a reação do tipo II envolve a transferência direta de energia entre o estado T_1^* do FS e 3O_2 disponível no meio, causando a inversão do spin do elétron e gerando 1O_2 (YANO et al, 2011). Vale destacar que as reações do Tipo I e II podem acontecer simultaneamente, e que tanto as EROs geradas pela transferência de elétron quanto o 1O_2 são capazes de reagir com moléculas biológicas (como proteínas e

aminoácidos) causando estresse oxidativo (BACELLAR et al, 2015; CASTANO et al, 2005).

3.1.1 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores são compostos sensíveis à luz, capazes de capturar energia luminosa na forma de fótons e transferi-la para outras moléculas (ACKROYD et al, 2001). Um bom FS possui baixa toxicidade, estabilidade química, alto rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (Φ_Δ), além da seletividade a células e tecidos doentes e fácil eliminação do organismo. Outro fator determinante para o uso de um FS é sua ativação, que deve ocorrer somente quando irradiado com feixes de luz em comprimentos de onda específicos, evitando assim efeitos de fotossensibilidade prolongada (ALLISON et al, 2004).

Também vem sendo levados em consideração, como descrito por Allison e Sibata (2010), o custo e a disponibilidade comercial dos FS. Além da reprodutibilidade e confiabilidade é necessário que as formulações sejam acessíveis, permitindo que a TFD seja um tratamento integrativo e complementar a outras intervenções oncológicas (BAMRUNGSAP et al, 2012).

Vários compostos com propriedades fotossensibilizantes são relatados na literatura, como as porfirinas, as clorinas e os corantes (ALLISON et al, 2004; RAK et al, 2019). Uma das classificações utilizadas para esses compostos é baseada no período em que foram desenvolvidos, e os separa em 1ª, 2ª e 3ª gerações. A primeira geração de fotossensibilizadores é formada por moléculas derivadas da hematoporfirina (HpD), um macrociclo aromático estável com altos rendimentos de $^1\text{O}_2$ e absorção na região do vermelho. Apesar da ampla distribuição comercial e consolidação na literatura (Photosan®, Photohem®), os FS de primeira geração possuem desvantagens consideráveis como a baixa seletividade, complexidade da mistura de componentes, fotossensibilidade prolongada e baixa absorção na janela fototerapêutica (BONNETT e MARTÍNEZ, 2001; MFOUO-TYNGA et al, 2021). Um exemplo é o fármaco Photofrin®, considerado o “pai” dos FS modernos, que vem sendo utilizado no tratamento de câncer de bexiga, pele, pulmão e esôfago, mas

possui produção ineficiente de $^1\text{O}_2$ através da irradiação em 630 nm (dentro da janela fototerapêutica) e prolongada retenção no organismo, causando fotossensibilidade a luz visível e toxicidade em tecidos normais (ALLISON e SIBATA, 2010).

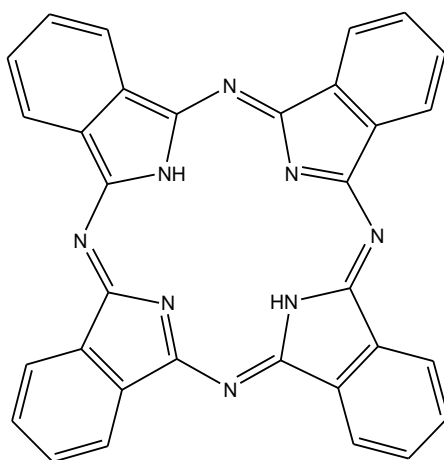
A segunda geração de fotossensibilizadores surgiu no final dos anos 1980, e engloba compostos sintéticos purificados, como clorinas, porfirinas, curcumina e pirróis. Apesar da semelhança estrutural com a HpD, esses FS apresentam alta absorção na região da janela fototerapêutica, implicando em pouca ou nenhuma toxicidade na ausência de luz, alta taxa de produção de EROs e acúmulo seletivo em tecidos devido ao efeito EPR (efeito de permeabilidade e retenção aumentada) (RAK et al, 2019). Bown e colaboradores (1986) abriram o caminho ao demonstrar que a ftalocianina de cloro-alumínio sulfonada produz fotossensibilização mais prolongada que a HpD, e ao mesmo tempo causa menor sensibilidade à luz ambiente.

Dentre os FS de 2ª geração também estão as ftalocianinas (Fc), compostos semicondutores que possuem em sua estrutura anéis benzênicos ligados a cada uma das quatro subunidades pirrólicas, conectadas entre si por átomos de nitrogênio (Figura 3). Seu arranjo altamente conjugado lhe confere baixa solubilidade e tendência a formar agregados em solução (associação coplanar por interações do tipo empilhamento π - π) (Figura 4), estabilidade e resistência a degradações químicas e fotoquímicas (LI et al, 2019; LIM et al, 2013; RAK et al, 2019). Além disso, as Fc possuem forte absorbância na região de 670 nm, ideal para uso em TFD. Esses FS podem ser ativados com doses de 100 J/cm^2 , e por sua característica extremamente hidrofóbica tendem a se acumular nas mitocôndrias, causando necrose e apoptose celular (BACELLAR et al, 2015).

Com o objetivo de melhorar a solubilidade em meios biológicos e aprimorar sua aplicabilidade, estudos envolvendo a complexação de metais (como zinco, magnésio, alumínio e cobalto) e a derivatização de Fc são cada vez mais comuns. Dałbrowski e colaboradores (2016, tradução nossa) descrevem que “a metalação de ftalocianinas e a escolha apropriada de ligantes axiais podem contribuir para a redução da tendência de agregação e melhorar a habilidade fotossensibilizadora desses compostos”. Barut e colaboradores (2021), a partir da reação de ciclotetramerização de um composto ftalonitrílico na presença de um sal metálico de

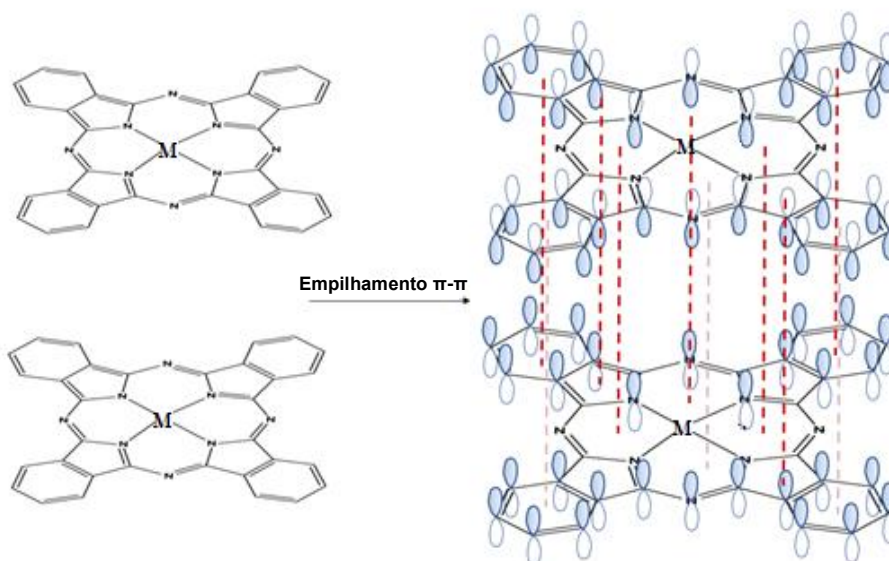
zinco ou magnésio, e posterior adição de iodometano, sintetizaram derivados das ftalocianinas de zinco (ZnPc) e magnésio (MgPc). Os compostos apresentaram boa solubilidade em água e valores de Φ_{Δ} em solvente aprótico de 0.59 e 0.36 respectivamente.

Figura 3 – Estrutura molecular das ftalocianinas.



Fonte: Própria autora.

Figura 4 – Representação das interações do tipo empilhamento π - π nas metaloftalocianinas.

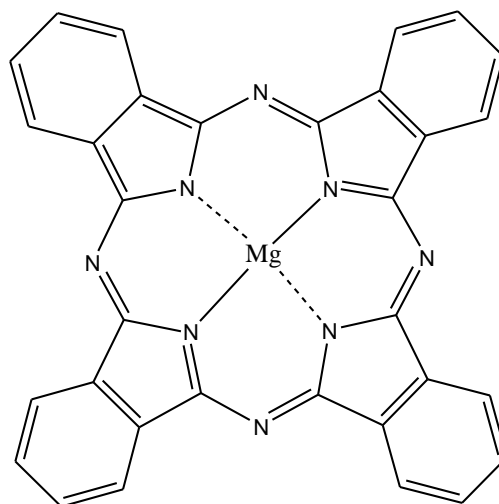


Fonte: Adaptado de (GOBO et al, 2013).

O produto comercial Photosens® é um bom exemplo do uso de metalofteralocianinas (MFc) na TFD. Essa ftalocianina de alumínio sulfonado vem sendo utilizada em tratamentos de tumores de pulmão e esôfago e em lesões e infecções bucais e de garganta, e está também em fase III de testes clínicos para tratamento de câncer de pele, câncer de mama, câncer de orofaringe e câncer de pulmão (RAK et al, 2019; YANO et al, 2011). Também vale destacar que grande parte dos compostos em fase de testes clínicos para TFD são MPcs, como a formulação de lipossoma contendo ftalocianina de zinco e a ftalocianina de silício, conhecida por Pc4 (RAK et al, 2019).

Uma das MFcs menos estudada quanto à finalidade fototerapêutica é a ftalocianina de magnésio (MgPc) (Figura 5). Uma rápida pesquisa no portal de periódicos *Science Direct* revela pouco mais de 290 resultados referentes à MgPc, e grande parte se referem ao seu emprego em catálise e ciência dos materiais. Apesar dos escassos estudos para seu emprego em fins terapêuticos, a MgPc apresenta emissão em $\lambda \approx 670$ nm, estabilidade fotoquímica e baixa toxicidade relativa ao centro metálico de magnésio (II), características-chave para um bom FS (ŁAPOK et al, 2014).

Figura 5 – Estrutura molecular da metalofteralocianina MgPc.



Fonte: própria autora.

A terceira geração de FS surge a partir da necessidade de aperfeiçoar os mecanismos de entrega de substâncias de interesse, aumentando sua biodisponibilidade e acúmulo em tecidos doentes e diminuindo sua toxicidade em células saudáveis. Nos compostos dessa geração o fotossensibilizador encontra-se conjugado à biomoléculas como aminoácidos e anticorpos, ou encapsulado em nanoestruturas (lipossomas, micelas e nanocápsulas poliméricas, nanoemulsões e dendrímeros) (JIN & ZHENG, 2011; SETARO et al, 2020; TYNGA et al, 2021).

3.2 NANOESTRUTURAS CARREADORAS

Nanopartículas poliméricas (NP) são partículas coloidais com tamanho entre 10 e 1000 nm, preparadas utilizando variados tipos de polímeros sintéticos ou naturais, e vêm recebendo grande atenção quanto ao encapsulamento de substâncias hidrofóbicas (BAMRUNGSAP et al, 2012). A camada polimérica confere estabilidade a esses compostos, aumentando a biodistribuição e o tempo de permanência na corrente sanguínea (SHANMUGAPRIYA e KANG, 2019).

Avanços na ciência e engenharia de polímeros resultaram no desenvolvimento de polímeros inteligentes (polímeros estímulo-sensíveis), que podem alterar suas propriedades físico-químicas em resposta a sinais do ambiente. Sinais físicos (temperatura, ultrassom, luz, eletricidade e estresse mecânico), químicos (pH e força iônica) e biológicos (enzimas e biomoléculas) têm sido usados como estímulos desencadeadores. [...] A versatilidade das fontes de polímero e sua fácil combinação tornam possível controlar a sensibilidade do polímero em resposta a determinado estímulo dentro de uma pequena faixa, levando a uma liberação de fármaco mais precisa e programável. (BAMRUNGSAP et al, 2012, tradução nossa).

Além das características já citadas, o uso de polímeros também é de interesse por sua biocompatibilidade. Como descrito por Rak e colaboradores (2019)

Seu tamanho ajustável e uniformidade evitam o reconhecimento por macrófagos e estendem seu tempo de circulação na corrente sanguínea. Enquanto FS são protegidos contra a degradação enzimática, as NP são capazes de penetrar nas células e permitir a liberação controlada do FS. (RAK et al, 2019, tradução nossa).

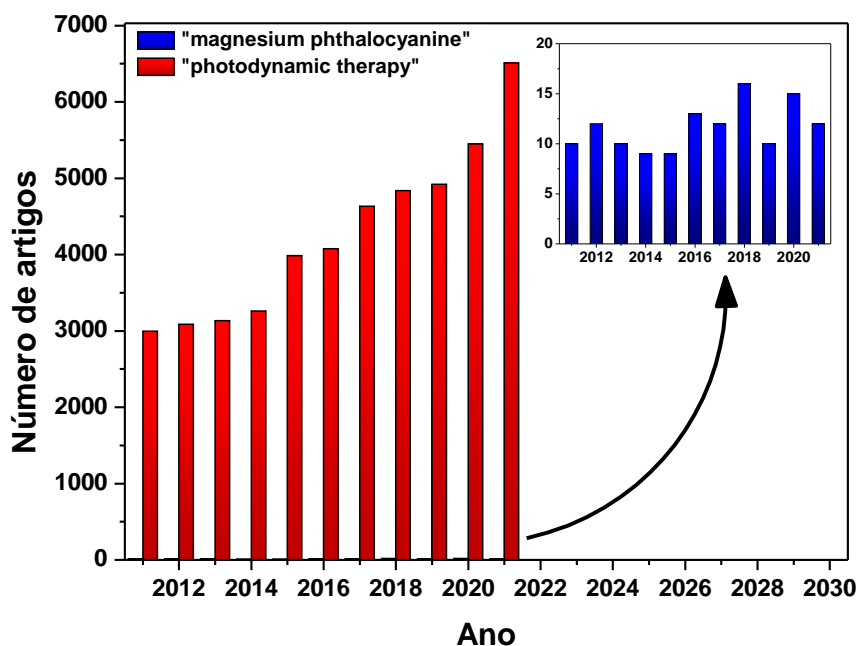
Micelas poliméricas são formadas a partir da interação entre um copolímero em bloco e o meio (solvente), levando em conta a concentração micelar crítica (CMC) e a temperatura de Krafft, ponto cuja solubilidade e concentração do polímero são suficientes para sua organização em agregados micelares (ROUVIERE et al, 1983). Um exemplo é a autoassociação de copolímeros em bloco baseados em maltoheptaose, que ocorre devido à sua natureza anfifílica, derivada da combinação de blocos hidrofílicos como maltoheptaose (MH) e blocos hidrofóbicos como poliestireno (PS), polimetilmetacrilato (PMMA), poli-isopreno (PI) e poli- ϵ -caprolactona (PCL). Quando esses CPB são dissolvidos em um solvente que é termodinamicamente bom para somente um dos blocos acontece a auto associação das cadeias poliméricas, levando à formação de estruturas do tipo *core-shell* (VILLETTI, 2021). Para os casos onde o meio é aquoso (mais comuns ao se tratar de aplicações biológicas) as porções hidrofílicas do bloco polimérico formam uma “casca” enquanto as porções hidrofóbicas formam o núcleo.

A encapsulação de FS utilizando nanoestruturas poliméricas aumenta o tempo de circulação e a biodisponibilidade da substância no organismo por proporcionar proteção em ambientes críticos (pHs extremos, degradação química, reconhecimento por macrófagos) e aumentar sua solubilidade em meio aquoso (BAMRUNGSAP et al, 2012). Além disso, a possibilidade de liberação controlada e de aumento na seletividade de entrega do FS, com diferenciação entre células saudáveis e doentes, são pontos que chamam a atenção dos pesquisadores. A entrega de substâncias utilizando nanoestruturas pode ser feita por (i) direcionamento passivo, que está relacionado à propriedades patofisiológicas do tecido alvo e ao efeito de permeabilidade e retenção do FS, (ii) direcionamento ativo a células cancerígenas, utilizando ligantes que se conectam a receptores presentes no sítio alvo, (iii) direcionamento ativo a células endoteliais, utilizando ligantes que se conectam aos vasos sanguíneos dos tumores, e (iv) direcionamento estímulo-

responsivo, utilizando sistemas que dependem de estímulos externos para realizar a liberação do composto (LAMMERS et al, 2012).

Levando em consideração a MgPc, composto de interesse no presente trabalho, uma pesquisa com os termos *magnesium phthalocyanine* e *photodynamic therapy* em portais de periódicos (*Science Direct* e Portal da Capes) indicou, respectivamente, pouco mais de 260 e 63090 artigos publicados entre os anos de 2011 e 2021 (Figura 6). Com pode ser observado, formulações de NP contendo MgPc são pouco descritas na literatura até o presente momento, já a investigação tema TFD vem crescendo ao longo dos anos. Por esse motivo será apresentada uma pesquisa do estado da arte envolvendo NPs contendo MgPc, mas também FS como a ZnPc, AIClPc (ftalocianina de cloro alumínio) e curcumina, com finalidade para aplicação em TFD.

Figura 6 - Número de publicações entre 2010 e 2021 contendo os termos *magnesium phthalocyanine* e *photodynamic therapy*.



Fonte: Banco de dados do Portal Capes (Pesquisa realizada em 09/01/2022).

Shipunova e colaboradores (2022) prepararam nanopartículas de poli(ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) contendo MgPc, recobertas ou não com quitosana, através do método de microemulsão óleo em água, para aplicação em Terapia Fototérmica (TFT). As NPs apresentaram Dh de 208 nm, morfologia esférica e estabilidade fototérmica. Os autores demonstraram que as NPs podem ser utilizadas para imageamento de células através de fluorescência, pois em períodos de incubação de 4 horas foi observado acúmulo intracelular do FS. Além disso, a PLGA/MgPc se mostrou mais eficiente na transferência de energia absorvida pela irradiação de um laser ($\lambda = 808$ nm) em energia térmica quando comparada a NPs contendo ftalocianina, ftalocianina de cobre (II) e ftalocianina de manganês (II), onde uma amostra contendo 1 g/L de NPs produz uma variação de até 40 °C, temperatura essa que não é tão bem suportada por células tumorais.

Os autores ainda realizaram ensaios de TFT com PLGA/MgPc em culturas de células humanas de câncer de ovário com expressão de proteína Katushka (SKOVip-kat). Foi observada citotoxicidade dependente da concentração de NP e do tempo de irradiação de laser, e aumento da penetrabilidade para a formulação contendo quitosana. Os resultados utilizando um modelo tridimensional, que simula a alta densidade celular de massas tumorais, e proteínas de abertura de junção intercelular (JO-4), demonstraram efeito fototérmico similar ao do modelo tradicional quando a PLGA/MgPc é associada à pré-injeção de JO-4 e irradiação por laser. Proteínas JO são moléculas capazes de induzir a abertura dos contatos intercelulares em tecidos epiteliais normais, aumentando a permeabilidade de substâncias. A inibição do crescimento tumoral em até 92% após 15 dias de TFT foi observada ao aplicar o mesmo tratamento em tumores mamários de ratos, indicando que a MgPc é um composto promissor para TFT (SHIPUNOVA et al, 2022).

Nanopartículas de poli [9,9'-bis(6"-bromohexil)floureno-2,7-ileno-vileno-co-alt-fenileno] (PFV), um polímero capaz de doar energia, contendo MgPc, um composto acceptor de energia, foram preparadas pelo método de reprecipitação por Li e colaboradores, visando a utilização em microscopia de excitação de dois fótons (2PE). 2PE é um método de bioimageamento não invasivo que tem como vantagens a alta profundidade de penetração e a capacidade de mapeamento tridimensional. As nanoestruturas apresentaram Dh de 27 nm, viabilidade celular frente a culturas de carcinoma hepatocelular humano (HepG2) acima de 85%, estabilidade fotofísica

e eficiência de transmissão de energia entre MgPc e polímero de até 71,5%. O imageamento foi feito utilizando um microscópio confocal após 8 horas de exposição das células à PFV/MgPc. Os resultados demonstraram alta fluorescência na região de 800 nm, proporcionando excelente contraste e indicando que as NPs foram internalizadas pelas células e encontram-se próximas ao núcleo, o que é ideal para sua aplicação em 2PE.

Asziri e colaboradores (2013) prepararam nanopartículas de CTAB (brometo de cetiltrimetilamônio), SDBS (p-dodecilbenzenossulfonato de sódio) e Triton-100, surfactantes catiônico, aniônico e neutro, respectivamente, utilizando irradiação de ultrassom para encapsular MgPc. Os autores realizaram testes de formulação variando as concentrações de FS, surfactante e tempo de sonicação. Foi relatado um aumento da intensidade de absorção do FS diretamente proporcional à concentração de MgPc e ao tempo de sonicação utilizados, o que indica que a encapsulação do FS nesses sistemas evita a agregação e permite sua dispersão em meio aquoso. Além disso, foi observado deslocamento batocrômico da banda Q (aumento no comprimento de onda de absorbância), que pode ser explicado pela interação entre MgPc e o surfactante, alterando sua distribuição eletrônica e/ou simetria.

De Paula e colaboradores (2013) desenvolveram nanopartículas utilizando PLGA, PLA e ácido polilático-co-poli(etilenoglicol) (PLA-PEG) para encapsular AICIPc. Além da alta eficiência de encapsulamento (até 96%) e estabilidade, os pesquisadores relataram perfil de liberação controlada ao longo de 168 horas, e efeito fototóxico *in vitro* acima de 80% em fibroblastos humanos.

Nanopartículas de metoxi(poli(etilenoglicol))-b-poli(ácido láctico) (mPEG-bPLLA) para encapsulação de ZnPc foram preparadas e testadas em células cancerígenas (Me45) por Lamch e colaboradores (2016). Os resultados de citotoxicidade das NPs indicam inibição de crescimento tumoral e indução de apoptose celular. Além disso as micelas poliméricas apresentaram compatibilidade com células saudáveis como queratinócitos, macrófagos e células endoteliais.

Pound-lana e colaboradores (2019) relataram D_h entre 63 e 114 nm e potencial zeta com valores de -7 a -14 mV para nanopartículas de poli(etilenoglicol)-b-ácido(polilático) funcionalizadas com benzil-glicidil éter (PEG-b-P(LA-co-BGE))

contendo AICIPc. As nanoestruturas também apresentaram eficiência de encapsulamento acima de 98% e cinética de liberação controlada, dependente do grau de funcionalização do copolímero em bloco.

Vilsinski e colaboradores (2018) prepararam micelas poliméricas de copolímero em bloco de poliestireno-b-poli(ácido acrílico) (PS-b-PAA) para encapsulação de AICIPc. As NPs apresentaram tamanho de 200 nm e baixo índice de polidispersão (0,121). Além disso, ensaios de fototoxicidade frente a células Caco-2 constataram ausência de citotoxicidade no escuro e danos celulares após 30 min de irradiação de luz LED (663 nm e dose de $1,62 \mu\text{J}\cdot\text{cm}^{-2}$), o que corroborou com o bom valor de geração de oxigênio singleto (0,3).

Lamch e colaboradores (2019) descreveram o preparo de nanopartículas de polietilenoglicol-b-poli(ácido láctico) modificadas com ácido fólico (FA-PEG-b-PLLA) para encapsulação de ZnPc. A potencial aplicação das NPs foi avaliada por estudos de imageamento e citotoxicidade frente a culturas celulares de câncer de ovário (SKOV-3) e melanoma (Me45), onde foi observada uma distribuição de FS no citoplasma e no núcleo células, além de resultados promissores para aplicação do nanocarreador em TFD.

Micelas poliméricas de copolímero em bloco MH-b-PI contendo curcumina foram preparadas por Caldas e colaboradores (2020). As nanopartículas apresentaram viabilidade celular acima de 88% em células tumorais (Caco-2, PC3, Hela, SiHa e C33) e saudáveis (HaCat, Vero e fibroblastos L929) na ausência de curcumina, o que demonstra a não toxicidade do polímero utilizado na formulação.

A atividade fotodinâmica da ZnPc encapsulada em nanopartículas de carboximetil quitosa (CMQ) e líquido iônico monocatiônico (brometo de 1-dodecil-3-metilimidazol) foi investigada por Eban e colaboradores (2021). As nanopartículas de escala nanométrica (134 a 152 nm) apresentaram potencial zeta negativo, baixos índices de polidispersão (abaixo de 0,25) e alta eficiência de encapsulamento (acima de 98%). Os autores também relataram que os valores de rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) produzidos pelo FS encapsulado e o perfil de liberação sustentada da substância são apropriados para sua aplicação em TFD.

Levando em consideração essas informações, faz-se necessário o desenvolvimento e avaliação de novos fotossensibilizadores de terceira geração a

partir de estudos na área de terapia fotodinâmica. Os objetivos e justificativas apresentados para este trabalho são baseados no crescente número de estudos envolvendo copolímeros em bloco baseados em oligossacarídeos e na lacuna de pesquisas envolvendo a encapsulação de ftalocianina de magnésio. É de fundamental importância para a nanomedicina, então, o estudo envolvendo o preparo e caracterização de NPs de MH-b-PS e MH-b-PMMA contendo MgPc para aplicação em TFD.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os reagentes ftalocianina de magnésio (MgPc) (90%), ftalocianina de zinco (ZnPc) (97%), poli- ϵ -caprolactona (PCL, Mw = 70 kD à 90 kD), monoestearato de sorbitano (Span[®] 60), polisorbato 80 (Tween[®] 80) e 1,3-difenilisobezofurano (DPBF) (97%) foram adquiridos na Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os copolímero em bloco Maltoheptaose-bloco-poliestireno (MH_{1.2k}-b-PS_{4.5k}) e Maltoheptaose-bloco-polimetilmetacrilato (MH_{1,2k}-b-PMMA_{4,1k}) foram gentilmente cedidos pelo grupo de pesquisa do CERMAV (Université Grenoble Alpes, Grenoble, França) e o óleo Labrathec Lipophile WL 1349 (triglicerídeo de cadeia média) foi adquirido da Gattefossé SAS (Saint-Priest, França). Os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCM) foram fornecidos pela Delaware (Porto Alegre, Brasil). Os solventes etanol, acetona e dimetilformamida (DMF) foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil), o dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Neon (São Paulo, Brasil) e o tetrahidrofurano (THF) foi adquirido da Synth (Diadema, Brasil). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico, sem purificação prévia, e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade menor do que 0.05 μScm^{-1}) (Milli-Q) coletada de um aparelho Millipore.

4.2 PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS

Foram preparados três nanocarreadores baseados na PCL e nos copolímeros em bloco MH-b-PS e MH-b-PMMA. As nanopartículas de PCL foram preparadas a partir do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, como descrito por Fessi e colaboradores (1989). Já as nanopartículas baseadas nos copolímeros foram preparadas pelo método de nanoprecipitação padrão, previamente descrito na literatura (OTSUKA et al, 2013; VILLETTI et al, 2021), com algumas modificações. A seguir descreve-se a preparação das três formulações em meio aquoso, feitas em triplicata (n=3).

4.2.1 Formulação A: nanopartículas de maltoheptaose-bloco-poliestireno (MH-b-PS@MgPc)

Em um frasco foram pesados 3,33 mg do copolímero em bloco MH-*b*-Ps, e os solventes THF (3,2 g) e água (0,8 g) (4:1 m/m). A solução foi mantida sob agitação magnética por 3 h, a 40 °C, e após o frasco foi coberto com papel alumínio e deixado em repouso *overnight*. No dia seguinte, em outro frasco foram pesados o óleo Labrathec (1,4 mg), 200 mg da solução de MgPc (150 µM em THF) e 1,8 g da solução de copolímero preparada no dia anterior. A mistura foi mantida sob agitação magnética, a temperatura ambiente, durante 30 minutos, e então foi adicionada gota a gota a 40 g de água ultrapura filtrada (filtro hidrofílico 0,45 µm – Millipore) sob agitação magnética. A mistura permaneceu sob agitação magnética por 2 h, à 25 °C, e depois foi evaporada sob pressão reduzida à 40 °C até o volume final de 4 mL. A dispersão coloidal resultante apresentou coloração azulada levemente opalescente, e aspecto homogêneo. A nanopartícula branca foi preparada seguindo o mesmo procedimento, mas sem a adição do composto MgPc.

4.2.2 Formulação B: nanopartículas de maltoheptaose-bloco-polimetilmetacrilato (MH-*b*-PMMA@MgPc)

No processo de produção das micelas poliméricas de MH-*b*-PMMA@MgPc alguns parâmetros foram testados, como a concentração do copolímero em bloco e a quantidade do óleo Labrathec. Em formulações com concentração mais alta de óleo observou-se a formação de uma suspensão opalescente e levemente azulada, sendo que o composto MgPc ficou visivelmente aderido às vidrarias utilizadas. Já ao aumentar a quantidade de CPB pode-se observar a desestabilização física do sistema em poucas horas, com formação de agregados e precipitação. Por fim, escolheu-se a formulação que apresentou melhor estabilidade termodinâmica (sem formação de precipitados e estável ao longo do tempo).

Em um frasco foram pesados 3,33 mg do copolímero em bloco MH-*b*-PMMA, e os solventes acetona (3,2 g) e água (0,8 g) (4:1 m/m). A solução foi mantida sob

agitação magnética por 3 h, a 40 °C, e após o frasco foi coberto com papel alumínio e deixado em repouso *overnight*. No dia seguinte, em outro frasco foram pesados o óleo Labrathec (1,7 mg), 200 mg da solução de MgPc (150 µM em THF) e 1,8 g da solução de copolímero preparada no dia anterior. A mistura foi mantida sob agitação magnética, à temperatura ambiente, durante 30 minutos, e então foi adicionada gota a gota a 40 g de água ultrapura filtrada (filtro hidrofílico 0,45 µm – Millipore) sob agitação magnética. A mistura permaneceu sob agitação magnética por 2 h, à 25 °C, e depois foi evaporada sob pressão reduzida à 40 °C até o volume final de 4 mL. A dispersão coloidal resultante apresentou coloração azulada levemente opalescente, e aspecto homogêneo. A nanopartícula branca foi preparada seguindo o mesmo procedimento, mas sem a adição do composto MgPc.

4.2.3 Formulação C: nanopartículas de poli-ε-caprolactona (PCL@MgPc)

Em um béquer de 50 mL foram adicionados 27 mL de acetona, 201 µL da solução de MgPc (372 µM em THF), 76,6 mg de Span[®] 60, 100 mg do polímero poli-ε-caprolactona e 330 µL do óleo TCM . A mistura foi mantida sob agitação magnética durante uma hora, a 40 °C. Em um erlenmeyer de 250 mL foram adicionados 54 mL de água ultrapura filtrada (filtro hidrofílico 0,45 µm – Millipore) e 76,6 mg de Tween[®] 80, em temperatura ambiente e sob agitação magnética, mantida durante 15 minutos para a solubilização do surfactante. Após, com o auxílio de um funil, a fase orgânica foi vertida na fase aquosa, sob agitação magnética na temperatura de 25 °C. A mistura permaneceu sob agitação durante 15 minutos, e então foi evaporada sob pressão reduzida à 40 °C até o volume final de 10 mL. A dispersão coloidal resultante apresentou coloração branco-azulada, e aspecto leitoso e homogêneo. A nanopartícula branca foi preparada seguindo o mesmo procedimento, mas sem a adição da MgPc.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

As nanopartículas foram caracterizadas através do diâmetro hidrodinâmico (Dh), índice de polidispersão (PDI), potencial zeta (ξ), teor total de MgPc (TT), eficiência de encapsulamento (EE) e estabilidade (LUMiSizer).

4.3.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

Os dados de Dh, PDI (do inglês “*polidispersity index*”) e ξ das nanopartículas foram obtidos utilizando o equipamento Nanozetasizer ZS (Nano ZS Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK), que opera com uma fonte de *laser* de He-Ne ($\lambda = 663$ nm e $P = 5$ mW). O espalhamento de luz foi medido em um ângulo fixo (θ) de 173° , na temperatura de 25°C .

A determinação de Dh e de PDI foi feita através da técnica de medida do espalhamento de luz dinâmico (DLS, do inglês “*dynamic light scattering*”), e o potencial zeta foi determinado pela medida da mobilidade eletroforética. As amostras para as análises de DLS, PDI e potencial zeta foram preparadas como descrito abaixo.

A nanopartícula PCL@MgPc e sua NP branca foram diluídas 250 vezes, com água ultrapura filtrada (filtro hidrofílico $0,45\ \mu\text{m}$ – Millipore), devido à sua alta opalescência. Já as nanopartículas MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e suas respectivas NPs brancas foram analisadas diretamente, sem fator de diluição, já que não apresentam o fenômeno de retroespalhamento que poderia interferir na análise de DLS.

4.3.2 Eficiência de encapsulamento e teor total de MgPc

Para determinar a eficiência de encapsulamento (EE) das NP, foi feita a comparação entre a quantia de MgPc livre (FL - não encapsulado) e de MgPc total (FT). O teor de FL foi determinado pela coleta do líquido filtrado no processo de separação das nanopartículas por centrifugação conjunta de ultrafiltração (Amicon®

Ultra 0,5 mL, MW 10000, Millipore, Carrigtwohill, Irlanda). A força centrífuga foi ajustada de acordo com a formulação (3000 xg para PCL@MgPc e 3500 xg para MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc), e o tempo utilizado foi de 10 minutos em cada ciclo (6 a 10 ciclos). O ultrafiltrado foi mantido na estufa *overnight*, à 40 °C e sob vácuo para a remoção total do solvente e então foi redissolvido no mesmo volume de DMF e quantificado.

O teor de FT foi determinado pela dissolução de 375 µL de dispersão coloidal para 5 mL de solução final em DMF. As suspensões foram mantidas sob agitação magnética durante 5 minutos à temperatura ambiente, e após este tempo foram quantificadas.

Os conteúdos de FL e FT foram determinados pelo método de fluorescência utilizando λ de excitação da amostra de 610 nm com emissão em 675 nm. Os valores de intensidade de fluorescência foram convertidos para valores de concentração de MgPc utilizando uma curva de calibração como padrão quantitativo. Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram calculados utilizando as Equações 1 e 2, respectivamente, onde DP é o desvio padrão do coeficiente linear e S é o coeficiente angular da reta.

$$LOD = 3,3 \times \frac{DP}{S} \quad (1)$$

$$LOQ = 10 \times \frac{DP}{S} \quad (2)$$

A porcentagem da eficiência de encapsulamento (EE) foi calculada a partir da Equação 3, e a porcentagem de teor total de MgPc (TT) foi calculada a partir da Equação 4 (onde CT é a concentração teórica de MgPc). Esse método de quantificação de ftalocianinas foi validado por Siqueira e colaboradores (2010).

$$EE = \frac{FT-FL}{FT} \times 100 \quad (3)$$

$$TT = \frac{FT \cdot 100}{CT} \quad (4)$$

4.3.3 Estabilidade física dos nanocarreadores

A estabilidade das nanopartículas contendo MgPc foi determinada através de ensaios em um analisador de dispersões (LUMiSizer, LUM GmbH, Berlim, Alemanha), que utiliza força centrífuga para acelerar fenômenos de instabilidade física, como sedimentação, floculação e cremeação (LIU et al, 2016). A análise é baseada na detecção da luz transmitida em função do tempo e em diferentes posições na amostra, dados esses que permitem a obtenção do índice de instabilidade ou taxa de cremeação (LIU et al, 2016; SOBISCH e LERCHE, 2008). Foram colocados em tubos individuais de policarbonato 200 μ L das NPs em meio aquoso, posteriormente inseridos no equipamento de LUMiSizer. As amostras foram irradiadas com um feixe de luz no comprimento de onda de 865 nm e centrifugadas a 528,6 ($\pm 0,7$) xg (2000 rpm), na temperatura de 25 °C. A luz transmitida ao longo da cubeta de policarbonato foi detectada durante 12 horas (43080 segundos), e os resultados obtidos permitiram a determinação do índice de instabilidade das NPs.

4.3.4 Avaliação morfológica das nanopartículas

A fim de determinar a morfologia e o diâmetro aproximado das nanopartículas, foi realizada a análise de microscopia de força atômica (AFM), utilizando o microscópio de força atômica Park NX10 (Park Systems Corporate Headquarters, Suwon, Coreia do Sul). As amostras foram preparadas a partir da diluição das formulações em 250 vezes, em água ultrapura, seguida da deposição de uma gota da solução em placas de mica clivada e secagem *overnight* na temperatura de 25 °C. O fator de diluição das amostras foi determinado através de

testes, onde observou-se que o uso das suspensões coloidais puras ou pouco diluídas resulta na aglomeração das nanopartículas, gerando imagens de baixa qualidade. Após secas, as amostras foram fixadas em um suporte metálico com auxílio de fita dupla-face, e analisadas utilizando o modo de contato intermitente. As imagens obtidas foram tratadas utilizando os programas XEI (Park Systems) e Gwyddion.

4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA

O monitoramento da reação de fotodegradação de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) é um método analítico de quantificação indireta da geração de $^1\text{O}_2$ (EBANI et al, 2021; HADJUR et al, 1998). Para a análise foram adicionados em um béquer 2 mL de DPBF (100 μM em DMSO), 100 μL da solução de nanopartículas contendo MgPc e 1,9 mL de DMSO. Dessa mistura, 3,5 mL foram colocados em uma cubeta de quartzo, junto de uma barra de agitação magnética. A solução foi irradiada com um laser no comprimento de onda de 660 nm, na potência de 30 mW, durante um tempo definido de acordo com a amostra, com intervalo de irradiação de 5 ou 10 segundos. Após cada período de irradiação a amostra foi analisada em um espectrofotômetro UV-VIS, gerando espectros de absorvância entre 300 e 800 nm, na temperatura de 25 °C. A análise também foi realizada para as nanopartículas brancas, com tempo total de 200 segundos de irradiação.

Por não encontrar na literatura um valor de rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para MgPc em DMSO, foi necessário utilizar como padrão o rendimento quântico da ZnPc. Os valores de rendimento quântico padrão (Φ_{Δ}°) para a MgPc foram então calculados utilizando as Equações 5 e 6. O valor de Φ_{Δ}° para a ZnPc é conhecido ($\Phi_{\Delta}^{\circ} = 0,67$ em DMSO) (KUZNETSOVA et al, 2000), o que torna possível determinar Φ_{Δ}° da MgPc livre, e, conseqüentemente, o Φ_{Δ} da MgPc nos sistemas nanoestruturados.

$$\frac{I_{\text{std}}}{I} = \frac{(1-(10^{-A_{\text{std}}}))}{(1-(10^{-A}))} \quad (5)$$

$$\Phi_{\Delta} = \Phi_{\Delta}^{\circ} \cdot \frac{k}{k_{std}} \cdot \frac{I_{std}}{I} \quad (6)$$

A_{std} é a absorvância do padrão utilizado em 660 nm, comprimento de onda de irradiação do laser; A é a absorvância da amostra em 660 nm; k é a constante cinética da fotodegradação do DPBF na presença do FS; k_{std} é a constante cinética da fotodegradação do DPBF na presença do FS padrão.

4.5 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O perfil cinético de liberação *in vitro* da MgPc foi obtido através de um ensaio empregando-se o método do saco de diálise, e tendo como meio de liberação a mistura de tampão ácido acético/acetato de sódio no pH 5,4 e DMF (20:80 v/v) (EBANI et al, 2021). Inicialmente adicionou-se 1,0 mL da dispersão coloidal no saco de diálise (Sigma Aldrich, peso molecular *cut-off* 14.000 Da, membrana de celulose, largura plana média de 33 mm), que foi então lacrado e mergulhado em 10 mL do meio de liberação. O sistema foi mantido sob agitação magnética e na temperatura de 37 °C durante todo o experimento. Em intervalos de tempo pré-determinados foram coletadas alíquotas do meio externo, que foram quantificadas em relação à presença de MgPc pelo método de fluorescência utilizando λ de excitação da amostra de 610 nm. A partir de uma curva de calibração os valores de intensidade de fluorescência detectados em 677 nm foram convertidos para valores de concentração de MgPc liberada ao longo do tempo (LOD e LOQ foram calculados como descrito previamente). As alíquotas retiradas foram devolvidas para o sistema imediatamente após a análise, a fim de manter o volume de meio externo constante.

Após, partiu-se para a determinação do mecanismo de liberação referente a cada sistema nanoestruturado. Como descrito por Siepmann e Peppas (2012), apesar da complexidade de certos sistemas, descartar processos secundários evita que os modelos matemáticos se tornem demasiadamente intrincados. Cabe ao

pesquisador, então, identificar o fenômeno de transporte principal, que irá descrever o mecanismo de liberação estudado. (SIEPMANN & PEPPAS, 2012)

Para avaliar o mecanismo de liberação da MgPc das nanopartículas foram utilizados seis modelos matemáticos. São eles o modelo de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixson Crowell, Korsmeyer-Peppas e biexponencial, apresentados na Tabela 1 (EBANI et al, 2021; VILLETTI et al, 2021).

Tabela 1 – Modelos matemáticos utilizados para analisar o perfil de liberação da MgPc nas nanopartículas.

Modelo	Ordem zero	1ª Ordem	Higuchi	Hixson-Crowell	Korsmeyer-Peppas	Biexponencial
Equação	$F = kt$	$\ln F = kt$	$F = k_H \sqrt{t}$	$\sqrt[3]{F} = kt$	$F = kt^n$	$F = F_0 (1 - ae^{-k_1 t} - be^{-k_2 t})$

F é a concentração de MgPc; F_0 é a concentração inicial de MgPc; k são as constantes referentes à cada modelo; t é o tempo decorrido; k_H é a constante de Higuchi; n é o expoente de tempo no modelo de liberação de Korsmeyer-Peppas; a e b são coeficientes pré-exponenciais do modelo biexponencial; k_1 e k_2 são as constantes referentes à primeira e segunda etapas de liberação, respectivamente. Fonte: (Ebani et al, 2021).

4.6 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Todas as análises de caracterização, avaliação fotoquímica, estabilidade e cinética de liberação in vitro foram realizadas em triplicata ($n = 3$). A partir dos resultados foram gerados valores médios e de desvio padrão, que indicam a uniformidade e confiabilidade dos dados. As análises estatísticas presentes na discussão dos resultados foram realizadas no programa Origin 8.5 utilizando a análise de variância simples (ANOVA), seguidas pelo teste de comparação múltipla de Tukey com $p < 0,05$. As triplicatas completas e os resultados individuais estão dispostos nos apêndices.

4.7 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

4.7.1 Nematódeos: cultura e tratamento

Para a avaliação da toxicidade das nanopartículas foi utilizada a cepa Bristol N2 (tipo selvagem) de *Caenorhabditis elegans*, fornecida pelo Caenorhabditis Genetics Center (Universidade de Minnesota, Twin Cities, MN, USA) e mantida a 20 °C em placas de petri contendo NGM (do inglês “*nematode growth medium*”) e *Escherichia coli* OP50, fonte de alimento para os nematódeos (ZEČIĆ, DHONDT E BRAECKMAN, 2019). Para obter vermes de estágio L1, populações de nematódeos hermafroditas adultos grávidos foram tratadas com solução de lise (200 µL de NaOH 10 M + 800 µL de hipoclorito de sódio + 1,0 mL de água), como descrito por Porta-De-La-Riva e colaboradores (2012). Os ovos foram colocados em tampão M9 (0.3% KH₂PO₄, 0.6% Na₂HPO₄, 0.5% NaCl), e mantidos *overnight* a 20 °C. Após 14 h os ovos eclodiram e liberaram as primeiras larvas (L1), que foram utilizadas nos experimentos. Todas as etapas foram realizadas em temperatura controlada de 20 °C.

4.7.2 Exposição às nanopartículas

Para a análise de toxicidade, 150 vermes foram expostos a 500 µL de um meio líquido contendo um volume determinado de dispersão de nanopartículas (100, 200 ou 400 µL). Em seguida os nematódeos foram transferidos para placas contendo NGM com *E. coli* OP50, e incubados a 20 °C por 24 h. Como descrito por Park e colaboradores (2017), a taxa de sobrevivência foi analisada através da observação dos vermes com um estereomicroscópio, onde indivíduos sem resposta ao toque foram considerados mortos. As análises foram feitas em duplicata e repetidas ao menos três vezes, utilizando nanopartículas com e sem FS.

4.7.3 Análise do desenvolvimento larval

A análise do desenvolvimento larval é amplamente utilizada em ensaios toxicológicos na literatura, e vem também aparecendo na área de nanopartículas (BOSCH et al, 2018; HU et al, 2018). Nela, é verificado se a exposição à substância de interesse interfere negativamente no crescimento e desenvolvimento das larvas, além de sua letalidade. Para a análise, 10 vermes de cada grupo foram paralisados utilizando uma mistura de 10 μ L de solução de levamisol (57,84 mM) e 10 μ L de água, e então fotografados utilizando um microscópio óptico (Olympus, modelo SZ2-LGB). O comprimento dos nematódeos foi medido da cabeça à cauda através do software ImageJ. Os experimentos foram feitos de forma independente e repetidos ao menos três vezes (n = 30 animais por grupo).

4.7.4 Mapeamento das nanopartículas in vivo

A análise de mapeamento de nanopartículas é utilizada para confirmar a ingestão da substância de interesse pelos nematódeos *C. elegans*. O imageamento foi realizado através da técnica de microscopia confocal com fluorescência, onde 150 vermes foram tratados com meio líquido contendo 200 μ L de suspensão de NPs (MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc ou PCL@MgPc). As nanopartículas apresentam fluorescência na região do vermelho devido à presença de MgPc, que possui uma complexa estrutura eletrônica e λ de emissão próximo a 670 nm. Após a exposição, os vermes foram lavados quatro vezes com tampão M9, e em seguida foram imobilizados em uma placa de ágar com azida de sódio (50 μ M). As imagens de fluorescência vermelha dos vermes N2 tipo selvagem foram capturadas utilizando o microscópio confocal Olympus® Fluoview FV10i. O λ de excitação utilizado foi de 559 nm, e a emissão foi medida entre 615 e 670 nm.

4.7.5 Análise estatística da toxicidade

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov para verificar a distribuição normal e não normal. Para os ensaios com dados não paramétricos, foram utilizados os testes *post hoc* de Kruskal-Wallis e Dunn. A análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey, foi realizada para os dados paramétricos. A obtenção de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

O uso de fotossensibilizadores de segunda geração encapsulados em nanopartículas compõe a chamada terceira geração de FS, e é uma estratégia promissora para superar as barreiras de aplicação de FS hidrofóbicos. O presente trabalho tem como objetivo estudar as propriedades de micelas poliméricas dos copolímeros em bloco MH-b-PS e MH-b-PMMA contendo ftalocianina de magnésio, visando sua aplicação em TFD.

Copolímeros em bloco anfifílicos, como MH-b-PS e MH-b-PMMA, formam micelas poliméricas a partir de um processo de auto-organização de suas cadeias poliméricas. Isso só é possível, no entanto, quando a dispersão é preparada utilizando solventes compatíveis com apenas um dos blocos. No presente trabalho foram utilizadas as misturas de THF/H₂O (8:2 m/m) e acetona/H₂O (8:2 m/m) para dispersar os copolímeros em bloco MH-b-PS e MH-b-PMMA, respectivamente, e a dispersão coloidal foi adicionada em água (não solvente para PS e PMMA) para promover a formação de estruturas ordenadas em solução.

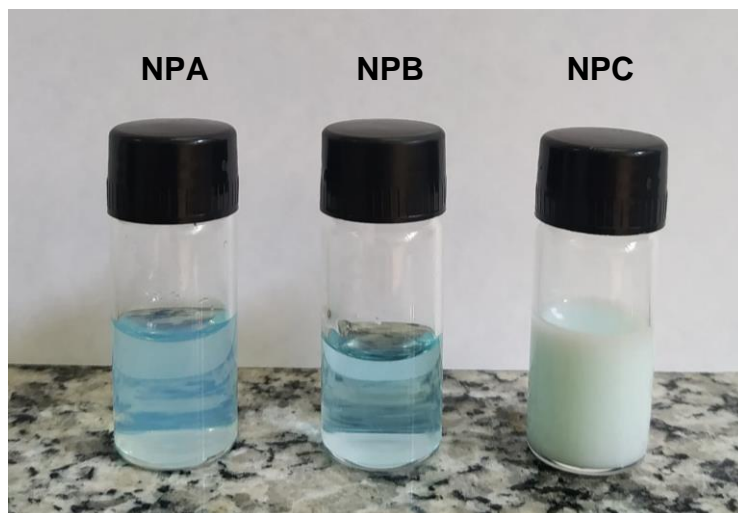
A proporção ideal das misturas (THF/H₂O e acetona/H₂O) para dispersar a parte hidrofóbica e hidrofílica dos copolímeros em bloco foi baseada na medida da intensidade de luz espalhada ($I(q)$) das dispersões. (OTSUKA et al, 2013; ZEPON et al, 2016). A $I(q)$ é proporcional ao produto da concentração do copolímero e a massa molar do agregado no regime diluído. Baixos valores de $I(q)$ indicam que o solvente utilizado é compatível com ambos os blocos poliméricos, sugerindo a presença de cadeias únicas, sem formação de agregados. Através de medidas de espalhamento de luz dinâmico, foram investigadas a $I(q)$ e as distribuições de tamanho das cadeias de MH-b-PS e MH-b-PMMA dispersas em THF/H₂O e acetona/ H₂O, respectivamente. Utilizando misturas na proporção 8:2 m/m foram encontrados valores mínimos de $I(q)$. Para a MH-b-PS o raio hidrodinâmico (R_h) encontrado foi de 2,5 nm (OTSUKA et al, 2013), enquanto que para a MH-b-PMMA foi de 4,1 nm

(ZEPON et al, 2016). O valor experimental do R_h da MH-b-PMMA concorda com o valor teórico ($R_h = 3,6$ nm) calculado com base na distância entre as extremidades da cadeia do polímero não perturbado ($\langle r \rangle = l \cdot \sqrt{N}$, onde l é o comprimento de uma unidade repetitiva e N é o número de unidades repetitivas) (ZEPON et al, 2016).

O preparo das micelas poliméricas de MH-b-PS e MH-b-PMMA contendo MgPc foi feito com base no método de nanoprecipitação padrão. Para a formulação de MH-b-PMMA@MgPc foram realizados testes variando-se a concentração do CPB e a quantidade de óleo Labrathec a fim de obter a dispersão coloidal mais estável. Para a preparação da MH-b-PS@MgPc a metodologia já está descrita na literatura (OTSUKA et al, 2013; VILLETTI et al, 2021). Otsuka e colaboradores (2013) também descreveram a metodologia de nanoprecipitação reversa, com adição da fase aquosa sobre a fase orgânica, que na ausência do óleo Labrathec leva à formação de NPs de R_h moderado. Contudo, na presença do óleo a utilização dessa metodologia fornece nanopartículas com R_h elevado e alta opalescência (VILLETTI et al, 2021). Empregou-se então a nanoprecipitação padrão para obtenção de nanopartículas com menor R_h , demonstrando que a escolha do método de preparação das NPs tem grande influência nas propriedades físico-químicas dos nanocarreadores.

Os sistemas nanoestruturados apresentaram homogeneidade macroscópica e estabilidade ao longo do tempo. Como pode ser visto na Figura 7, todas as formulações apresentaram tonalidade azul devido à presença da MgPc. As dispersões de MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc exibiram aspecto transparente, enquanto a dispersão PCL@MgPc exibiu aspecto opalescente, o que, além de ter relação com a concentração de polímero e surfactantes, sugere que as formulações baseadas nos CPB possuem um diâmetro hidrodinâmico (D_h) menor do que a nanopartícula de PCL@MgPc. Para verificar esta hipótese da diferença de tamanho foram realizadas análises de DLS.

Figura 7 – Aspecto visual das formulações de nanocarreadores em meio aquoso MH-b-PS@MgPc (NPA), MH-b-PMMA@MgPc (NPB) e PCL@MgPc (NPC).



Fonte: Própria autora.

5.1.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão e potencial zeta

Para avaliar o comportamento hidrodinâmico das NPs foi utilizada a técnica de DLS. O potencial zeta (ξ) foi determinado a partir da determinação da mobilidade eletroforética. A distribuição do tamanho das partículas e o potencial zeta para os sistemas MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc são apresentados nas Figuras 8, 9 e 10, respectivamente. As análises foram realizadas em triplicata independente, representada nos gráficos pelas linhas azuis, pretas e vermelhas, e os resultados referentes às NPs brancas estão dispostos no Apêndice A.

Os valores de D_h , PDI e potencial zeta são apresentados na Tabela 2. As curvas de distribuição monomodal e a estreita distribuição de tamanho observadas indicam que os sistemas podem ser considerados monodispersos (apenas um população).

Figura 8 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para MH-b-PS@MgPc em meio aquoso.

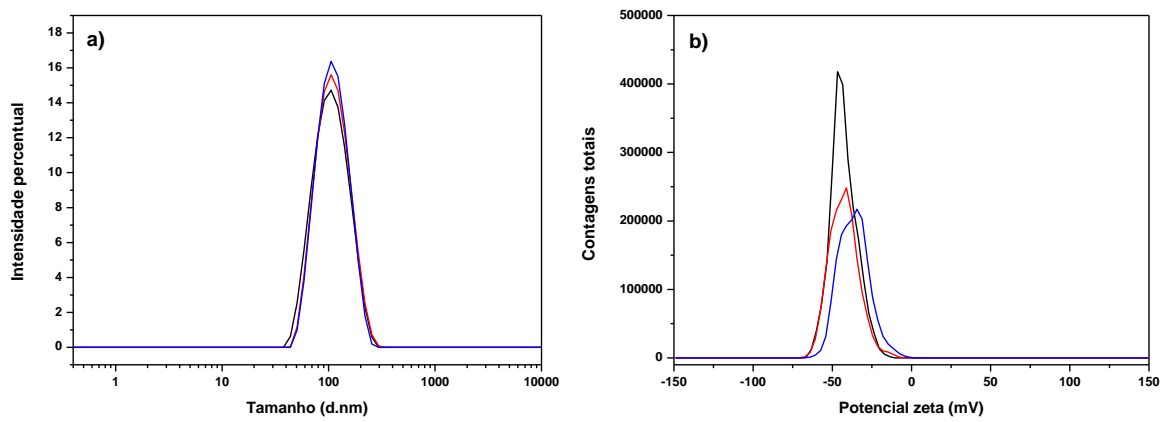


Figura 9 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para MH-b-PMMA@MgPc em meio aquoso.

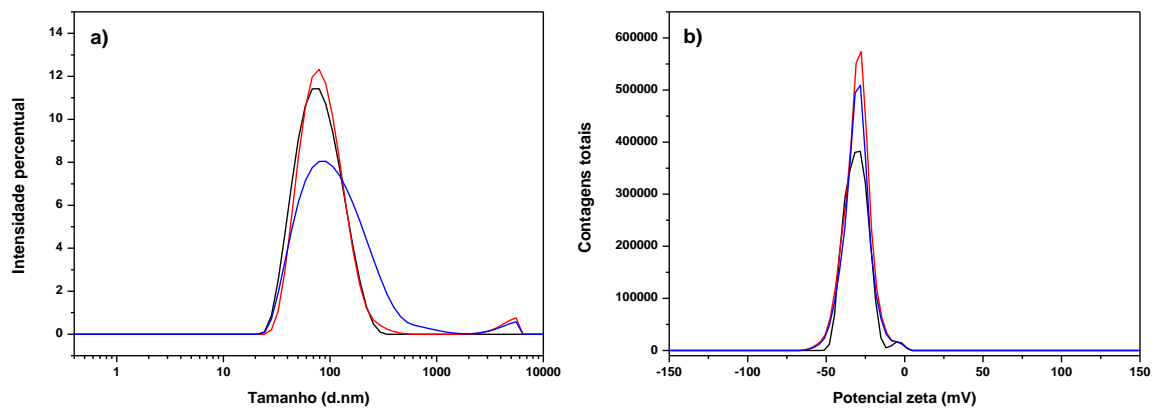


Figura 10 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para PCL@MgPc em meio aquoso.

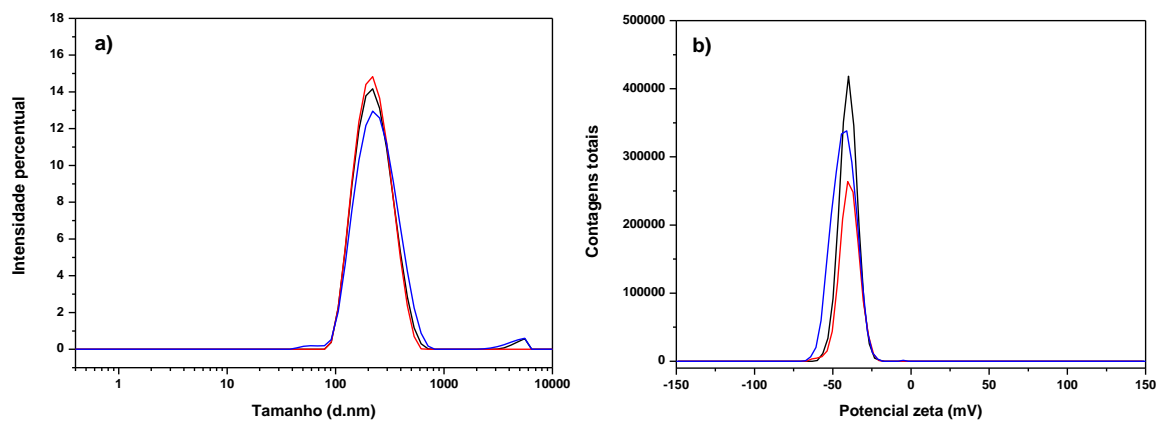


Tabela 2 – Resultados das análises de espalhamento de luz e potencial zeta para as nanopartículas em meio aquoso.

	D_h (nm)	PDI	ξ (mV)
MH-b-PS@MgPc	102 ± 2,8	0,104 ± 0,018	-38,9 ± 3,37
MH-b-PS@branca	98 ± 0,3	0,125 ± 0,008	-19,8 ± 0,40
MH-b-PMMA@MgPc	81 ± 10,4	0,227 ± 0,060	-30,4 ± 0,21
MH-b-PMMA@branca	102 ± 1,1	0,099 ± 0,026	-27,5 ± 1,05
PCL@MgPc	214 ± 7,7	0,158 ± 0,031	-40,8 ± 1,85
PCL@branca	200 ± 2,1	0,068 ± 0,030	-37,9 ± 0,12

Os resultados permitem afirmar que as dispersões coloidais apresentam tamanho na escala nanométrica e que os sistemas são homogêneos, pois têm baixos valores de PDI sendo o indicativo de apenas uma população de NPs. Os altos valores em módulo de potencial zeta indicam uma possível estabilidade termodinâmica.

Analisando os valores de D_h obtidos para as NPs é possível verificar que há diferença significativa de tamanho dos nanocarreadores ($p < 0,05$). Os sistemas MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc, apresentaram menor tamanho quando comparados a PCL@MgPc, o que explica a transparência das nanopartículas de copolímero em bloco. Esses resultados estão de acordo com o efeito Tyndall, que descreve a relação do tamanho das NPs com a transmissão da luz pelas dispersões coloidais.

Características como concentração e massa molar do polímero, tipo de surfactante, polaridade do solvente e método de preparo impactam diretamente nas propriedades físico-químicas dos sistemas nanoestruturados (MORA-HUERTAS et al, 2010). O maior tamanho da PCL@MgPc em relação às formulações baseadas em CPB pode ser explicado em função da maior massa molar do polímero PCL. A medida de tamanho para a formulação PCL@MgPc concorda com o valor da literatura (PCL@ZnPc: D_h = 190 nm) (DE SOUZA et al, 2016).

O tamanho em escala nanométrica dos sistemas contendo FS é fundamental para sua aplicação na TFD, já que está diretamente relacionado à entrega do composto no organismo. No caso da encapsulação de substâncias para fins terapêuticos, NPs menores que 200 nm têm potencial de permeação e difusão em uma variedade de tecidos, podendo se ligar a receptores nas células, sendo internalizados pelos compartimentos para liberação intracelular de substâncias (CALDAS et al, 2020). Resultados obtidos por Roger e colaboradores (2010) mostraram que há um aumento do transporte transcelular por transcitose para nanopartículas com tamanho de 100 nm, onde a eficiência de absorção pelo tecido intestinal foi de 15 a 250 vezes maior em comparação com partículas maiores (500 nm, 1 μ m e 10 μ m). Lamch e colaboradores (2019) obtiveram NPs de polietilenoglicol-b-poli(ácido láctico) modificadas com ácido fólico (FA-PEG-b-PLLA) com tamanho de 68 nm e observaram um acúmulo de composto no citoplasma de células de câncer de ovário, o que ressalta o potencial permeativo de NPs menores que 100 nm. Além disso, nanopartículas que apresentam tamanhos menores são mais adequadas para o acúmulo no alvo tumoral em relação às células normais devido ao efeito de maior permeabilidade e retenção (efeito EPR) (DAI et al, 2017; KULKARMI et al, 2013).

Portanto, considerando o mecanismo de transporte celular, a absorção em células cancerígenas e o efeito EPR é esperado que as micelas poliméricas MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc sejam nanocarreadores mais promissores em relação ao sistema PCL@MgPc. Em trabalhos anteriores foi mostrado que a célula cancerígena MCF-7 possuem uma superexpressão dos transportadores de glicose (ZENG et al, 2020), o qual poderia fornecer uma via de entrada preferencial para nanopartículas revestidas com açúcares, como observado para dendrímeros à base de poliamidoamina (PAMAM) modificados com glicose carregados com doxorubicina (SZTANDERA et al, 2019). Portanto, espera-se que os copolímeros em bloco baseados em maltoheptaose sejam internalizados com mais facilidade pelos receptores das células cancerígenas, aumentando a eficiência terapêutica da PDT.

O potencial zeta (ξ) está relacionado à carga da superfície de cisalhamento da partícula, e pode sofrer alterações de acordo com a formulação utilizada na preparação das NPs, tais como estrutura química dos polímeros e tensoativos, carga

da substância, força iônica e pH do meio (MORA-HUERTAS et al, 2010). Segundo a teoria DLVO, o potencial de repulsão eletrostática entre as partículas é diretamente proporcional ao quadrado do ξ , como mostrado nas equações 7 e 8.

A equação 7 se refere a partículas com dupla camada espessa ($a \ll r_D$), e a equação 8 a partículas com dupla camada delgada ($a \gg r_D$).

$$V_{\text{repulsão}} = + \frac{A a^2 \xi^2}{R} e^{-s/r_D} \quad (7)$$

$$V_{\text{repulsão}} = + \frac{1}{2} A a^2 \xi^2 \ln(1 + e^{-s/r_D}) \quad (8)$$

A é uma constante, a é o raio das partículas, R é a separação entre os centros, s é a separação entre as superfícies das duas partículas e r_D é a espessura da dupla camada. Portanto, os elevados valores em módulo do ξ para MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc são um indicativo de que as nanopartículas são estáveis ao longo do tempo.

Para os sistemas MH-b-PS@MgPc e PCL@MgPc os valores do ξ não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$). Para o sistema MH-b-PMMA@MgPc o ξ difere dos valores das outras nanopartículas ($p < 0,05$).

Comparando o potencial zeta das nanopartículas contendo MgPc com suas respectivas NPs brancas, pôde-se observar que nas micelas poliméricas há diferença significativa entre os valores ($p < 0,05$). Para a PCL@MgPc a presença do composto não gera diferença significativa no valor de ξ ($p > 0,05$). Esses resultados sugerem que parte da MgPc pode estar adsorvida na superfície das micelas poliméricas, ao passo que nas nanopartículas de PCL encontra-se encapsulado no núcleo lipofílico.

5.1.2 Eficiência de encapsulamento e teor total de MgPc

A eficiência de encapsulamento e o teor total de MgPc foram determinados utilizando-se o método de fluorescência. Os espectros de emissão de fluorescência da MgPc em função da concentração e a curva de calibração encontram-se no Apêndice B (Figuras B1 e B2, respectivamente). A região de linearidade da curva de calibração foi obtida no intervalo de $2,06 \cdot 10^{-2} \mu M$ a $2,23 \cdot 10^{-1} \mu M$, e os valores de limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foram de $4,84 \cdot 10^{-3} \mu M$ e $1,47 \cdot 10^{-2} \mu M$, respectivamente. Os valores de teor total de MgPc e eficiência de encapsulamento encontram-se na Tabela 3. Os valores da EE são elevados, não havendo diferença significativa entre os sistemas nanoestruturados ($p > 0,05$). Além disso, comparando o teor total de MgPc, percebe-se que as formulações de copolímeros em bloco apresentam um conteúdo de Fc maior do que a formulação de PCL.

Tabela 3 – Dados de eficiência de encapsulamento (EE) e concentração total de MgPc para os nanocarreadores.

	EE (%)	TT (μM)
MH-b-PS@MgPc	$97,10 \pm 0,22$	$1,22 \pm 0,006$
MH-b-PMMA@MgPc	$99,49 \pm 0,02$	$1,74 \pm 0,012$
PCL@MgPc	$96,43 \pm 0,08$	$1,09 \pm 0,017$

5.1.3 Estabilidade física dos nanocarreadores

A estabilidade das nanopartículas foi determinada empregando-se o equipamento LUMiSizer. Através desta técnica se torna possível estimar os fenômenos que podem perturbar a estabilidade dos sistemas nanoestruturados, como a floculação, a sedimentação, a coalescência, a coagulação e formação de creaming (SOBISH & LERCHE, 2008). A desestabilização dos sistemas coloidais se caracteriza pela mudança nas suas propriedades físico-químicas, e quanto mais lento for esse processo mais estável é a dispersão coloidal (KHAN et al, 2011).

Neste trabalho avaliamos a estabilidade física das formulações de NPs pela determinação da velocidade de desestabilização do sistema em meio aquoso. As medidas de porcentagem da luz transmitância em função do tempo, para cada posição da amostra na cubeta, são demonstrados na Figura 11.

O perfil de transmissão de luz fornece dados sobre as mudanças das características físico-químicas que acontecem na interface das partículas coloidais com o meio dispersante (LERCHE, 2002). Os resultados obtidos demonstram que as micelas poliméricas apresentam alta estabilidade quando comparadas ao sistema PCL@MgPc. Como pode ser observado nas Figuras 11-a e 11-b a porcentagem de luz transmitida ao longo do tempo para MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc praticamente não sofre alteração, o que é evidenciado pela sobreposição das linhas verdes e vermelhas. Na Figura 11-c percebe-se um aumento na porcentagem de luz transmitida na parte inferior da cubeta (linhas verdes), longo das 12 horas de análise, indicando a separação de fases para a PCL@MgPc.

A Figura 12 apresenta o aspecto das nanopartículas após o experimento de LumiSizer. Como observado na Figura 12-a e 12-b as dispersões são estáveis ao longo do tempo. Contudo, o fenômeno de desestabilização pode ser observado na Figura 12-c, visto que na parte inferior da cubeta a porcentagem de transmitância é maior do que na parte superior, evidenciando a formação de *creaming* na amostra da formulação de PCL@MgPc.

A análise por LUMiSizer fornece também dados de índice de estabilidade em função do tempo. A inclinação dessas curvas em cada ponto permite determinar a velocidade em que ocorre a separação das fases, indicando a cinética de desestabilização dos sistemas (SOBISCH & LERCHE, 2008). Os gráficos de índice de instabilidade em função do tempo obtido nas análises estão apresentados na Figura 13.

Avaliando os resultados de índice de instabilidade observa-se que a inclinação das curvas para os sistemas MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc é próxima a zero, indicando que a velocidade de sedimentação é baixa e que as micelas poliméricas são estáveis ao longo do tempo. Por outro lado, é visível um aumento no índice de instabilidade para as nanocápsulas de PCL contendo MgPc, o que implica em uma maior inclinação da curva e conseqüentemente uma maior

velocidade de sedimentação, indicando um sistema menos estável ao longo do tempo.

Figura 11 – Porcentagem de luz transmitida em função do tempo, a 25 °C, para as nanopartículas dispersas em meio aquoso (a) MH-b-PS@MgPc, (b) MH-b-PMMA@MgPc e (c) PCL@MgPc.

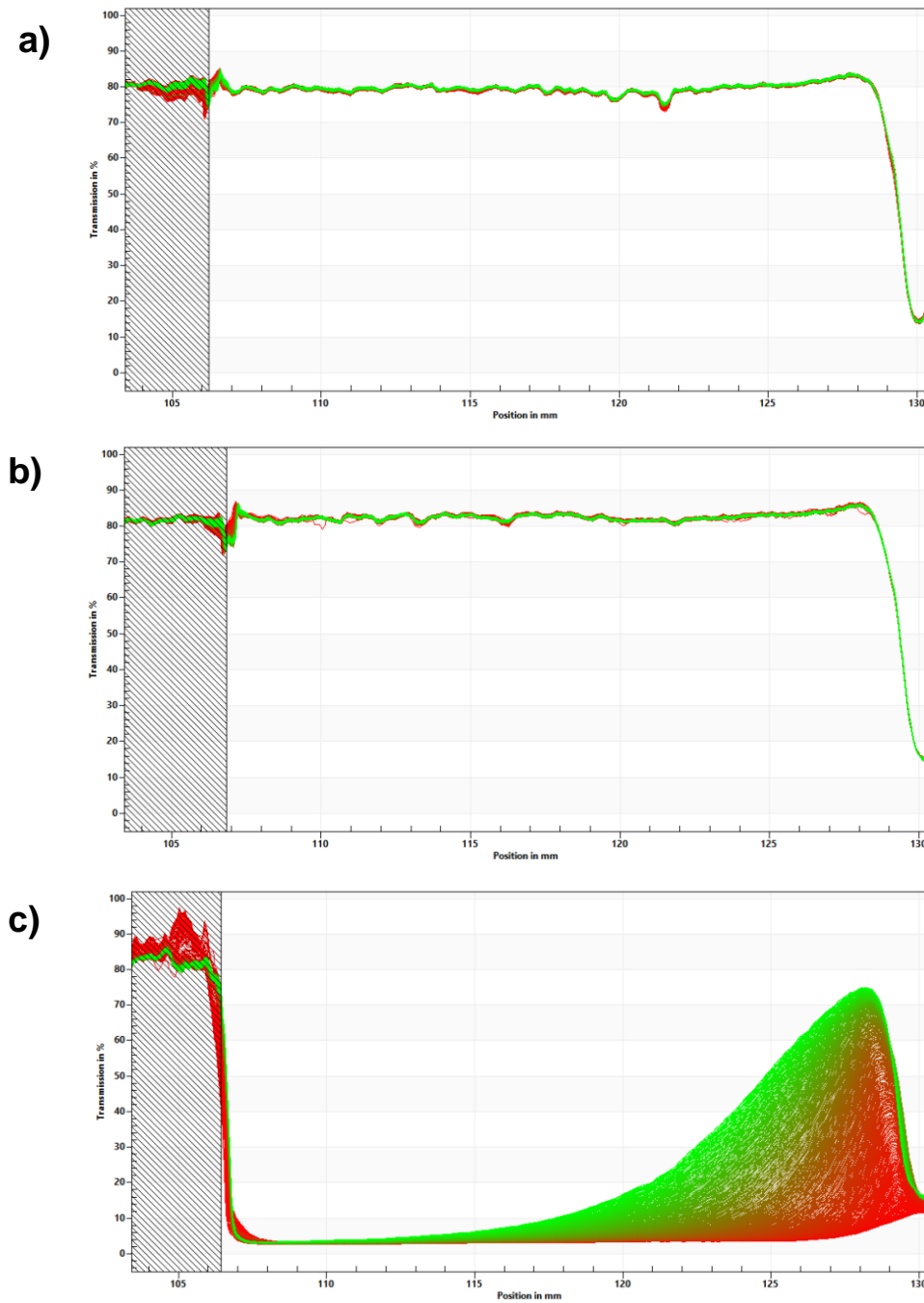


Figura 12 – Aspecto visual das nanopartículas dispersas em meio aquoso (a) MH-b-PS@MgPc, (b) MH-b-PMMA@MgPc e (c) PCL@MgPc após a centrifugação por LUMiSizer na temperatura de 25 °C.

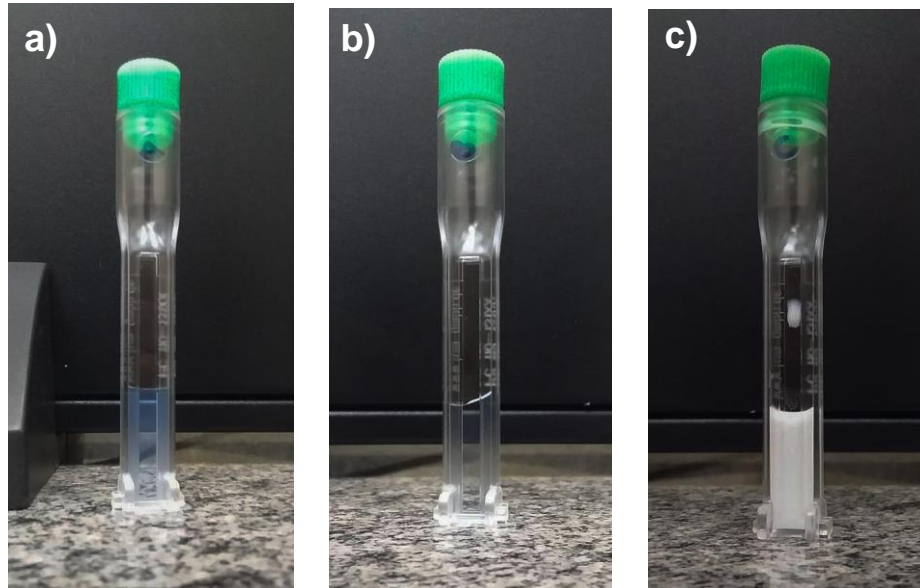
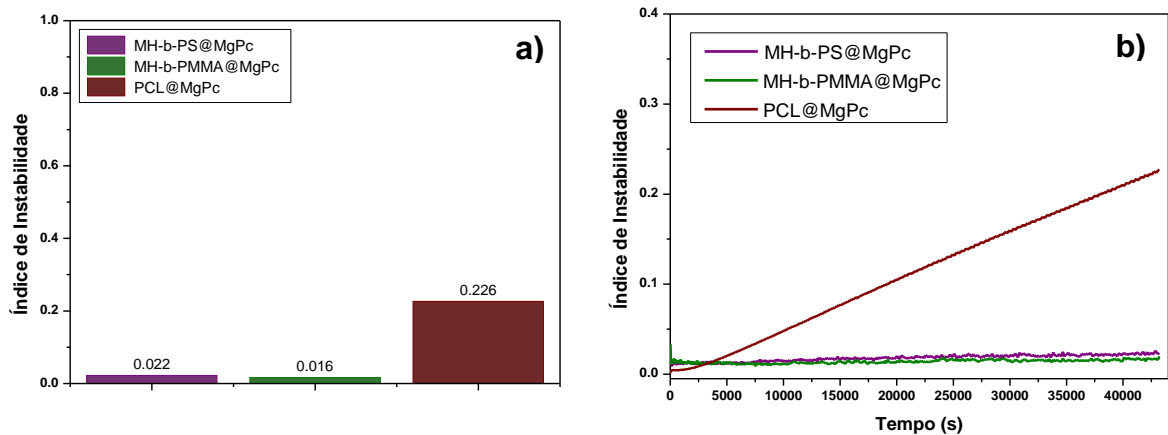


Figura 13 – (a) Índice de instabilidade e (b) Índice de instabilidade em função do tempo para as nanopartículas dispersas em meio aquoso MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc, na temperatura de 25 °C.



O índice de instabilidade pode variar de zero a um. Baixos valores (próximos de zero) indicam uma alta estabilidade termodinâmica das dispersões coloidais, ao passo que valores próximos a 1 indicam a instabilidade do sistema (LERCHE, 2002). A ordem de estabilidade das NPs é MH-b-PMMA@MgPc \approx MH-b-PS@MgPc > PCL@MgPc. Comparando esses valores é possível afirmar que as micelas

poliméricas são de 10 a 14 vezes mais estáveis que a formulação tradicional utilizando a PCL.

É possível observar que os dados obtidos estão diretamente relacionados à composição dos sistemas. Esse fato sugere que a maior concentração e massa molar do polímero PCL e o maior D_h das NPs podem estar afetando negativamente a estabilidade da formulação PCL@MgPc, favorecendo fenômenos de desestabilização física como a cremeação. Enquanto isso, a baixa concentração de CPB e óleo presentes nas formulações MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc fornece micelas com menor D_h , que são menos suscetíveis a desestabilização física e consequentemente mais estáveis ao longo do tempo.

Como relatado por Cavalcante e colaboradores (2020), valores de transmitância constantes no intervalo de uma hora equivalem a aproximadamente 3 meses de tempo de estabilidade física. Levando em conta que a análise foi realizada durante 12 horas, pode-se afirmar que os sistemas MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc são estáveis a fenômenos de desestabilização física por pelo menos 3 anos.

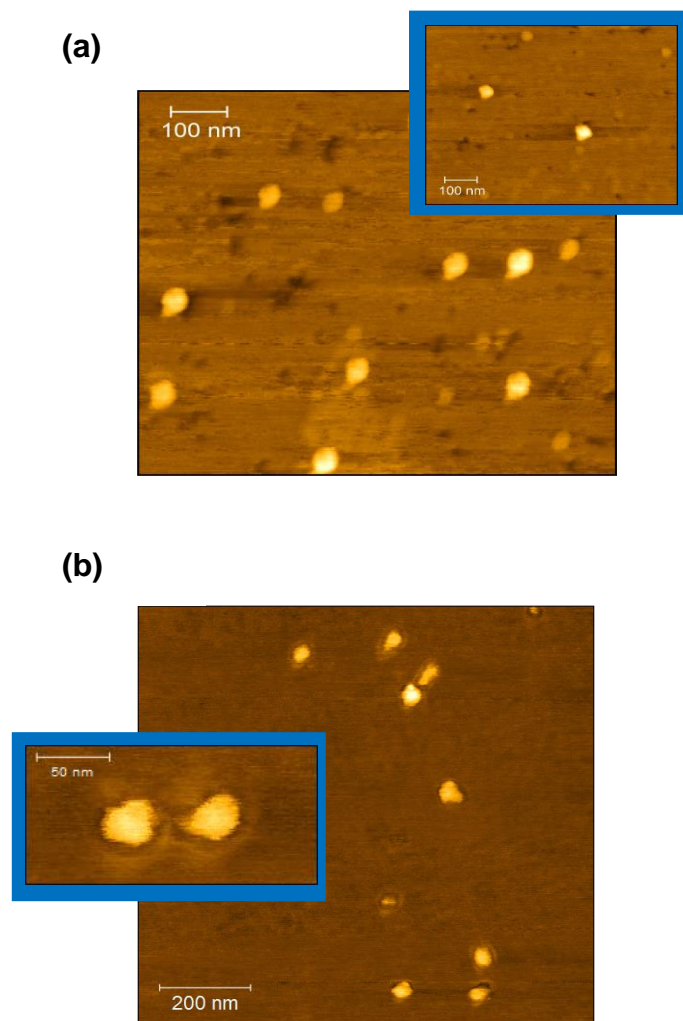
A partir dos dados de índice de instabilidade e velocidade de separação de fase é possível concluir que as micelas poliméricas MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc são carreadores mais promissores que PCL@MgPc. Esses sistemas estão em consonância com a necessidade de estabilidade da formulação contendo compostos para uso clínico, apresentando assim maior potencial para emprego na nanomedicina.

5.1.4 Avaliação morfológica das nanopartículas

A análise de microscopia de força atômica (AFM) permite a complementação dos dados de DLS e PDI através da determinação da morfologia e diâmetro aproximados (CALDAS et al, 2020). Como é possível observar na Figura 14, as micelas poliméricas MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc apresentam morfologia esférica e tamanho inferior a 100 nm. Utilizando a ferramenta de análise por região do programa XEI foram obtidos valores de diâmetro de 64,37 (\pm 6,24) nm e 58,39 (\pm

8,95) nm para MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc, respectivamente. Os valores abaixo do D_h podem ser facilmente explicados pelo tipo de amostra utilizada em cada análise. Os resultados de DLS se referem a nanopartículas dispersas em meio aquoso, que contam com uma camada de solvatação e raio de hidratação, enquanto que a técnica de AFM utiliza amostras em estado sólido, favorecendo o encolhimento das partículas, resultando em menores valores de diâmetro (CALDAS et al, 2020). As “auras” observadas na Figura 14 são chamadas artefatos de varredura, e são decorrentes das interações entre sonda e amostra.

Figura 14 – Imagens de AFM para as nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc e (b) MH-b-PMMA@MgPc.



Nos quadros em destaque são apresentadas imagens aproximadas das nanopartículas. Resultados obtidos utilizando o modo de contato intermitente, com amostra depositada sobre mica clivada.

A análise de AFM para a formulação PCL@MgPc não forneceu imagens de boa qualidade. Um possível fator para esse resultado é a desestabilização do sistema, o que é corroborado pelo baixo índice de estabilidade obtido na análise por LUMiSizer. Devido à remoção da camada de solvatação das partículas, fenômenos de aglomeração e desestabilização física são favorecidos, o que sugere a formação de agregados, impedindo a observação das nanopartículas de PCL@MgPc.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA

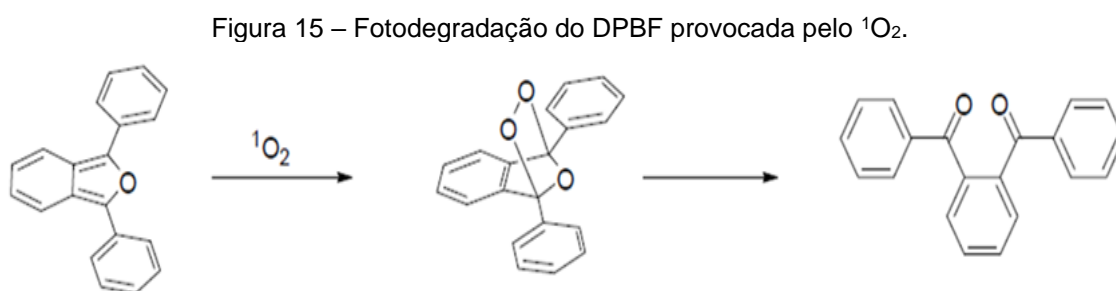
Para que os sistemas nanoestruturados sejam considerados promissores para emprego na TFD, é necessário investigar a capacidade de geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) do FS encapsulado. O $^1\text{O}_2$ é responsável por causar estresse oxidativo, o que causa danos à estrutura da célula-alvo e morte celular (CHEN et al, 2017; DĄBROWSKI, 2017).

A atividade fotodinâmica *in vitro* da MgPc encapsulada foi avaliada através do método da fotodegradação de 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) causada pelo $^1\text{O}_2$ gerado pelo FS. O uso de DPBF em solvente aprótico para a investigação da atividade fotodinâmica de nanopartículas já é bastante conhecido na literatura, sendo empregado para FS encapsulados em micelas (LU et al, 2019; ROMERO et al, 2013), micelas poliméricas de poliestireno-bloco-poli(ácido acrílico) (Ps-b-PAA) (VILSINSKI et al, 2018), nanocápsulas de PCL (DE SOUZA et al, 2016) e nanopartículas de carboximetil quitosana/líquido iônico (EBANI et al, 2021).

Sua vasta utilização em análises quantitativas se deve principalmente ao fato de que a reação do DPBF com $^1\text{O}_2$ gera o produto 1,2-dibenzilbenzeno, o qual não absorve luz em λ visível (Figura 15). Além disso, a redução de absorbância do DPBF tem relação direta com a geração de $^1\text{O}_2$ em reações do tipo II, já que as reações do tipo I tendem a ocorrer em meios com baixo teor de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) (HADJUR et al, 1998; ZHANG e LI, 2011).

Inicialmente, foram realizadas as análises da fotodegradação de DPBF na presença das nanopartículas sem fotossensibilizador. Como observado nas Figuras 16, 17 e 18, a irradiação de 200 segundos de laser promoveu apenas 3%, 2% e 4%

de decaimento na absorvância do DPBF para a NPA branca, NPB branca e NPC branca, respectivamente. Esses valores são pequenos quando comparados com os resultados obtidos na presença da MgPc, o que comprova que a geração de $^1\text{O}_2$ está relacionada à presença do FS e não devido aos polímeros MH-b-PS, MH-b-PMMA e PCL.



(Fonte: adaptado – GOBO, 2013)

Como observado na Figura 19, na presença da MgPc livre (não encapsulada), o pico de absorção do DPBF apresenta um rápido decaimento. O efeito da irradiação do laser, e conseqüente redução da concentração de DPBF, pôde ser observado visivelmente através do branqueamento da solução. É possível também descartar a reação direta entre o FS e DPBF, uma vez que a banda de absorção da MgPc ($\lambda = 675 \text{ nm}$) continuam intactas ao longo do período de irradiação. Esses resultados sugerem que a MgPc é um promissor FS para o emprego em TFD, visto que esta substância apresenta boa fotoestabilidade. Os espectros de duplicata e triplicata estão apresentados no Apêndice C.

A fim de determinar o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ da MgPc livre, o experimento de fotodegradação foi realizado na presença da ZnPc livre, que serviu como padrão para os cálculos. Esses dados estão dispostos no Apêndice C, Figuras C1 a C4.

Figura 16 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPA branca. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.

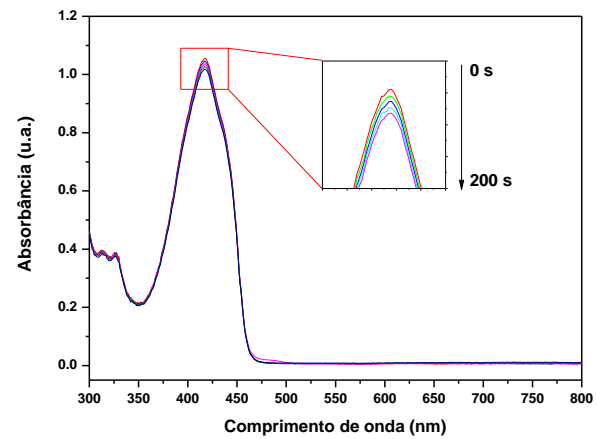


Figura 17 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPB branca. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.

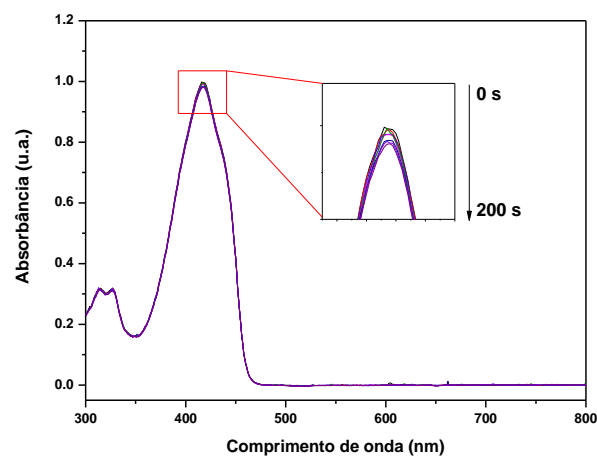


Figura 18 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPC branca. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.

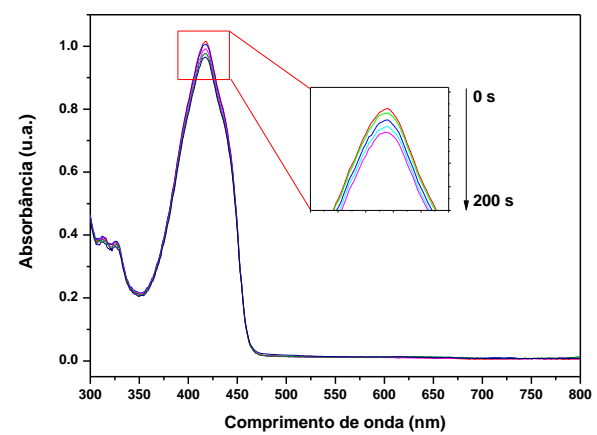
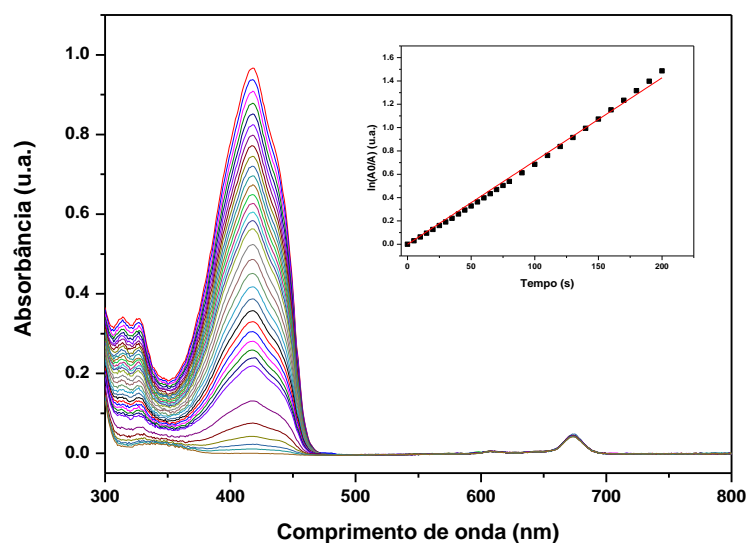


Figura 19 – Fotodegradação do DPBF pelo $^1\text{O}_2$ gerado pela MgPc livre. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.



Os espectros de fotodegradação do DPBF na presença dos sistemas nanoestruturados contendo a MgPc são apresentados nas Figuras 20, 21 e 22. Da mesma forma que na MgPc livre, observa-se o decaimento do pico de absorção do DPBF, indicando a geração de $^1\text{O}_2$. Além disso, é possível observar que todas as análises apresentaram ótima linearidade para $\ln\left(\frac{A_0}{A}\right)$ *versus* tempo, o que indica que os dados se adequam ao modelo cinético proposto (cinética de primeira ordem). A cinética de primeira ordem observada para a degradação do DPBF, na presença da MgPc livre ou das nanopartículas (MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc ou PCL@MgPc) concorda com o mecanismo proposto por Herath e colaboradores (2005), o qual envolve as seguintes etapas:

Etapa 1: ativação do fotossensibilizador (FS).



Etapa 2: cruzamento intersistema (singleto \rightarrow tripleto)



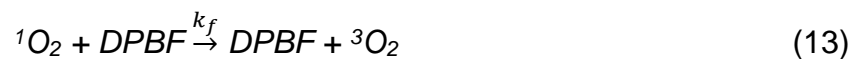
Etapa 3: formação de oxigênio singleto.



Etapa 4: degradação do DPBF.



Etapa 5: degradação física do oxigênio singleto.



Etapa 6: desativação molecular do oxigênio singleto.



onde o $h\nu$ é a luz incidida, I é o número de fótons incidentes, CI é o cruzamento intersistema e os k_Δ , k_q , k_f e k_d são as constantes cinéticas de formação do 1O_2 , de degradação química do DPBF pelo 1O_2 , de degradação física do 1O_2 e de desativação molecular do 1O_2 , respectivamente. Por k_f ter seu valor considerado

muito pequeno nesse modelo, ao comparar com k_q , assume-se que o DPBF não interage com o FS.

Aplicando-se a aproximação do estado estacionário para a lei de velocidade de formação do 1O_2 e para a velocidade de formação da $^1FS^*$ e 3FS obtemos as equações 15 e 16, respectivamente.

$$\frac{d}{dt} [^1O_2] = k_{\Delta} \cdot [^3FS^*] \cdot [^3O_2] - (k_q + k_f) \cdot [DPBF] \cdot [^1O_2] - k_d \cdot [^1O_2] = 0 \quad (15)$$

$$k_{\Delta} \cdot [^3FS^*] \cdot [^3O_2] = I_a \cdot \phi_{\Delta} \quad (16)$$

Para baixas concentrações de DPBF podemos considerar que $(k_q + k_f) \cdot [DPBF] \gg k_d$. A equação 17 é obtida a partir dessa aproximação na lei de velocidade de degradação do DPBF, e comprova que a cinética em questão é de primeira ordem. (HEARTH et al, 2005). O valor da constante de velocidade é obtido a partir da equação 18.

$$-\frac{d}{dt} [DPBF] = \frac{I_a \phi_{\Delta} k_q}{k_d} [DPBF] \quad (17)$$

$$\frac{I_a \phi_{\Delta} k_q}{k_d} = k \quad (18)$$

onde I_a é o número de fótons incidentes na amostra, k_q e k_d são as constantes cinéticas de degradação química do DPBF pelo 1O_2 e de desativação molecular do 1O_2 , respectivamente.

Na Tabela 4 são apresentados os valores das constantes de fotodegradação do DPBF (k), o coeficiente de determinação (R^2) e o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_{Δ}) para as NPs. A diferença nos valores de Φ_{Δ} para a ZnPc e

MgPc pode ser explicada pela natureza do centro metálico das ftalocianinas. O zinco (II) é um íon diamagnético de camada fechada, o que lhe confere alto rendimento tempo de vida do estado tripleto. Já íons como cobre (II), cobalto (II) e magnésio (II) são paramagnéticos de camada aberta, o que resulta em menor cruzamento intersistema, menor tempo de vida do estado tripleto, e consequente diminuição na capacidade de gerar $^1\text{O}_2$ (LI et al, 2018; LI et al, 2019).

Figura 20 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula MH-B-PS@MgPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação fotoquímica do DPBF. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.

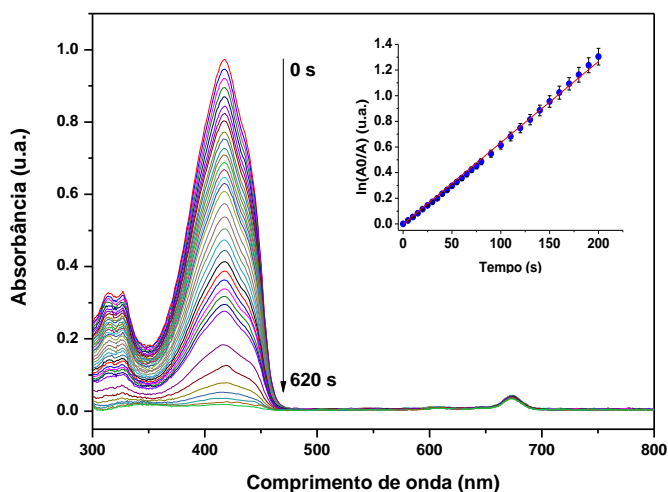


Figura 21 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula MH-B-PMMA@MgPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação fotoquímica do DPBF. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.

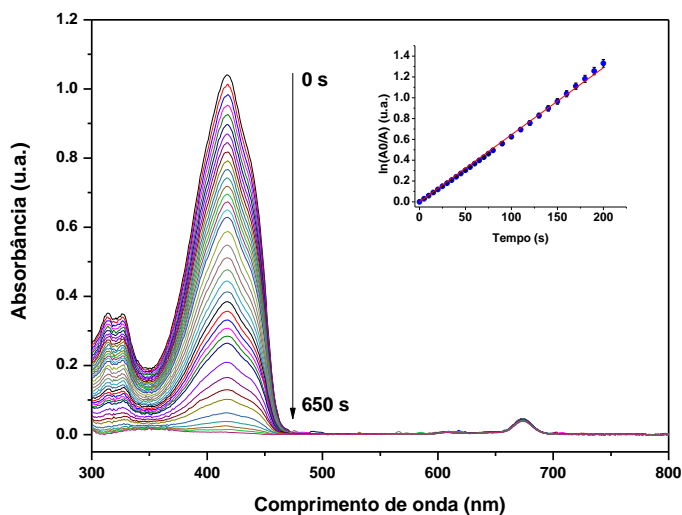


Figura 22 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula PCL@MgPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação fotoquímica do DPBF. Análise realizada em DMSO, na temperatura de 25 °C.

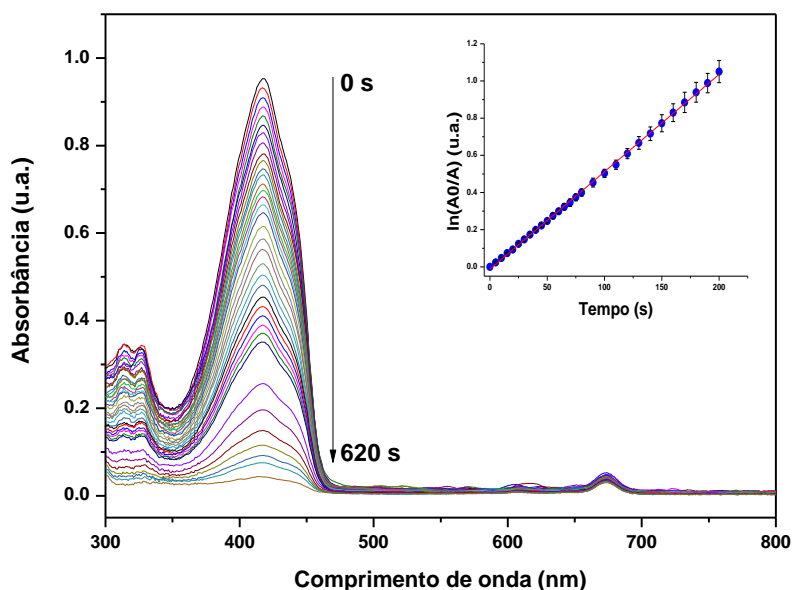


Tabela 4 – Constante de fotodegradação do DPBF (k), coeficiente de determinação (R^2) e rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) para PS livre e encapsulados.

	k (s^{-1})	R^2	Φ_{Δ}
ZnPc	$1,59 (\pm 0,09) \times 10^{-2}$	0,998	0,67 ^a
MgPc	$7,00 (\pm 0,00) \times 10^{-3}$	0,999	0,275 ($\pm 0,009$)
NPA	$5,87 (\pm 0,51) \times 10^{-3}$	0,999	0,256 ($\pm 0,030$)
NPB	$6,30 (\pm 0,30) \times 10^{-3}$	0,999	0,250 ($\pm 0,044$)
NPC	$5,00 (\pm 0,08) \times 10^{-3}$	0,999	0,157 ($\pm 0,019$)

Fonte: (KUZNETSOVA et al, 2000).

Os valores de Φ_{Δ} para MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc são semelhantes aos encontrados para a MgPc livre ($p > 0,05$). Para PCL@MgPc é possível uma menor atividade fotodinâmica quando compara a MgPc livre e as demais NPs ($p < 0,05$). Esses resultados indicam que micelas poliméricas de CPB baseados em maltoheptaose são carreadores promissores para emprego na TFD, uma vez que apresentam uma adequada atividade fotodinâmica após a

encapsulação. Os valores de Φ_{Δ} para a MgPc encapsulada nos nanocarreadores baseados na maltoheptaose são similares aos valores encontrados na literatura para o fotossensibilizador CIAIPc encapsulada em nanopartículas de PS-b-PAA ($\Phi_{\Delta}= 0,3$) (VILSINSKI et al, 2018).

5.3 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O uso de nanocarreadores para encapsulação de FS apresenta diversas vantagens, sendo a liberação controlada do composto de interesse a que mais desperta atenção dos pesquisadores. Variados modelos matemáticos são utilizados para descrever a cinética dos processos envolvidos na liberação do FS do sistema nanoestruturado (Hopfenberg, biexponencial, Weibull, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixon-Crowell, entre outros) (COSTA e LOBO, 2001).

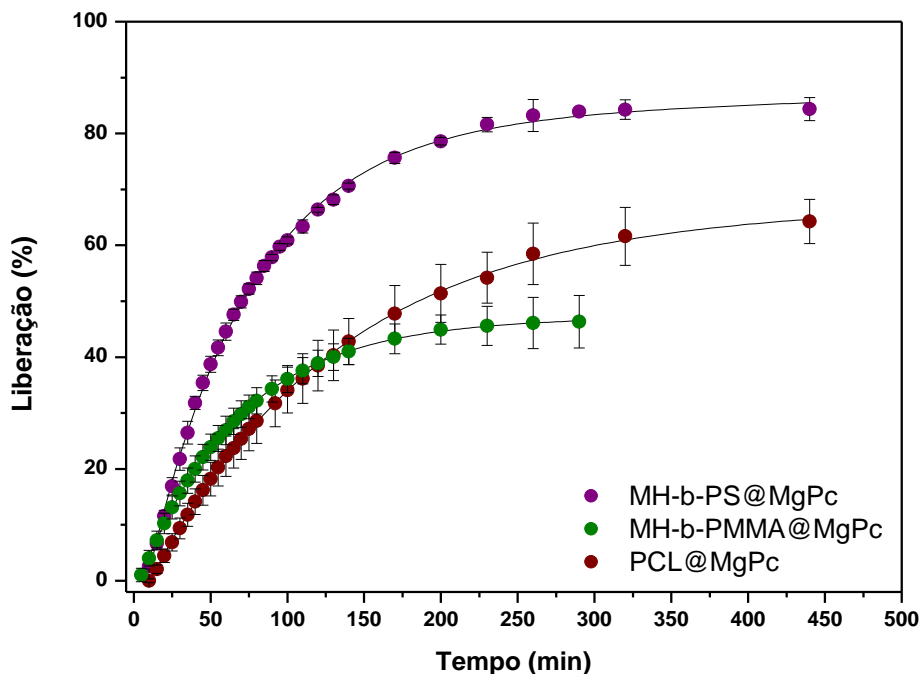
O perfil de liberação *in vitro* da MgPc encapsulada nos sistemas nanoestruturados foi determinado pelo método do saco de diálise. Na Figura 23 são apresentadas as curvas da porcentagem de liberação do composto encapsulado nas NPs em função do tempo. A quantificação do teor de MgPc liberada foi feita utilizando-se o método de fluorescência. Os espectros de emissão de fluorescência da MgPc em função da concentração, e a curva de calibração encontram-se no Apêndice D (Figuras D1 e D2). A região de linearidade da curva de calibração foi no intervalo de $3,95 \cdot 10^{-3} \mu M$ a $1,64 \cdot 10^{-1} \mu M$, e os valores de LOD e LOQ foram de $1,51 \cdot 10^{-3} \mu M$ e $4,58 \cdot 10^{-3} \mu M$, respectivamente.

Vários fatores podem interferir na liberação de FS, tais como a concentração da substância dentro das nanopartículas, as taxas de permeação através das nanoestruturas e da membrana de diálise, e a concentração efetiva do composto no saco de diálise (ALMEIDA et al, 2010). Vários mecanismos, como difusão, efeito osmótico ou erosão superficial podem reger a liberação de substâncias a partir de nanopartículas poliméricas (KAMALY et al, 2016).

A porcentagem de liberação da MgPc após 4,8 h de experimento foi de 83,9%, 46,3% e 60,0% para MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc, respectivamente. Como pode ser observado na Figura 23, a diferença no tempo total

dos experimentos é justificada pela estabilização mais rápida na liberação para MH-b-PMMA@MgPc, evidenciada pelo *platô*. Para a análise do perfil de liberação da MgPc foram utilizados seis modelos matemáticos (ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Korsmeyer-Peppas, Hixon Crowel e biexponencial), e os resultados de constantes cinéticas de liberação da MgPc (k) e de coeficientes de correlação (R^2) são apresentados no Apêndice D, Tabela D1.

Figura 23 – Perfil de liberação com *fit* biexponencial para MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc na temperatura de 37 °C.



Analisando os valores de R^2 (Tabela 5) constatou-se que o melhor modelo para descrever o perfil das NPs MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc é o biexponencial, que apresentou valores de R^2 mais próximos a 1. O perfil de liberação de compostos baseado nesse modelo divide-se em duas fases: (i) na fase I ocorre a rápida liberação da substância de interesse e (ii) na fase II ocorre a liberação sustentada e controlada da MgPc, sugerindo uma lenta difusão do composto. Avaliando os valores das constantes cinéticas de cada fase do modelo

biexponencial, observamos que os valores de k_1 e k_2 , condizem às fases I e II respectivamente, com k_1 maior que k_2 . Observando a ordem de grandeza das constantes relativas à fase I podemos inferir que há uma liberação mais rápida nas nanoestruturas micelares, o que pode ser explicado pela facilidade de difusão da MgPc em estruturas mais flexíveis quando comparada a nanocápsulas, que são mais rígidas.

Tabela 5 – Constante cinética (k) e coeficiente de determinação (R^2) resultantes da aplicação do modelo biexponencial para os dados de liberação dos sistemas MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc e PCL@MgPc.

Modelo Biexponencial ($F = F_0 (1 - ae^{-k_1t} - be^{-k_2t})$)			
	k_1	k_2	R^2
	a	b	
MH-b-PS@MgPc	$1,48 \cdot 10^{-2}$	$5,9 \cdot 10^{-4}$	0,9995
	0,93	0,18	
MH-b-PMMA@MgPc	$1,54 \cdot 10^{-2}$	$3,2 \cdot 10^{-5}$	0,9999
	0,49	0,53	
PCL@MgPc	$8,16 \cdot 10^{-3}$	$1,18 \cdot 10^{-4}$	0,999
	0,709	0,350	

Outro fator que pode explicar a liberação mais rápida de MgPc na fase I para os sistemas micelares é a possibilidade de parte do composto estar incorporado às cadeias poliméricas, ou até mesmo aderido à “casca” da micela. Essa sugestão é baseada no aumento em módulo do potencial zeta das formulações contendo MgPc quando comparado às suas respectivas NPs brancas. Além disso, como demonstrado pelos valores de eficiência de encapsulamento abaixo de 100%, parte do fármaco não foi encapsulado, podendo assim influenciar no potencial eletrostático da superfície das micelas, e ao mesmo tempo estar mais acessível ao meio externo da cinética de liberação.

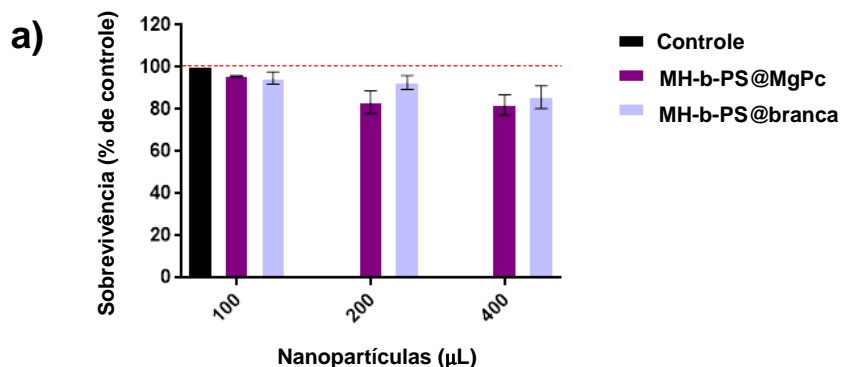
5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

5.4.1 Ensaio de taxa de sobrevivência

Com o objetivo de usar as NPs para fins terapêuticos avaliou-se a sua toxicidade frente aos nematódeos *C. elegans*. (LICHTENBERG et al, 2019; TOLEDANO et al, 2019) (ZHOU et al, 2015). Por apresentar diversas vias metabólicas similares aos dos vertebrados, os *C. elegans* fornecem informações de toxicidade do organismo (TOLEDANO et al, 2019; WU et al, 2019; ZHOU et al 2015).

A avaliação da toxicidade de MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc, PCL@MgPc e suas respectivas NPs brancas foi realizada expondo-se os *C. elegans* a diluições das suspensões coloidais. Os dados de taxa de sobrevivência em função do volume de NP utilizado são mostrados na Figura 24.

Figura 24 – Taxa de sobrevivência de vermes N2 expostos a diferentes volumes das nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc e MH-b-PS@branca, (b) MH-b-PMMA@MgPc e MH-b-PMMA@branca, e (c) PCL@MgPc e PCL@branca durante 1 hora.



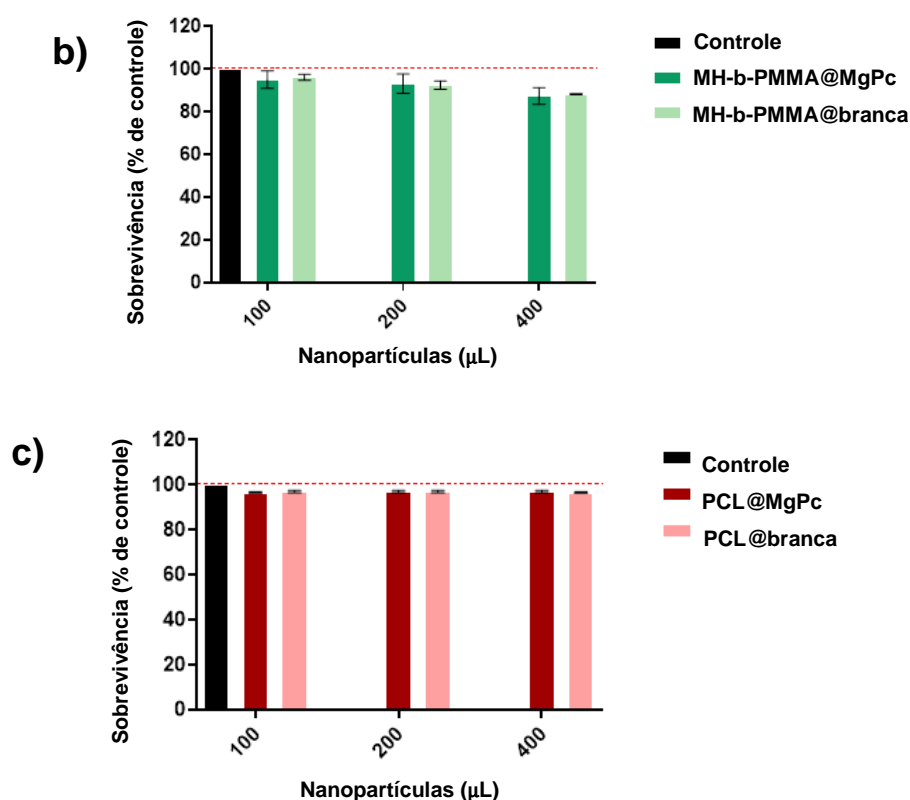


Tabela 6 – Letalidade (%) em função do volume utilizado das nanopartículas contendo ou não MgPc. Valores destacados indicam letalidade significativa.

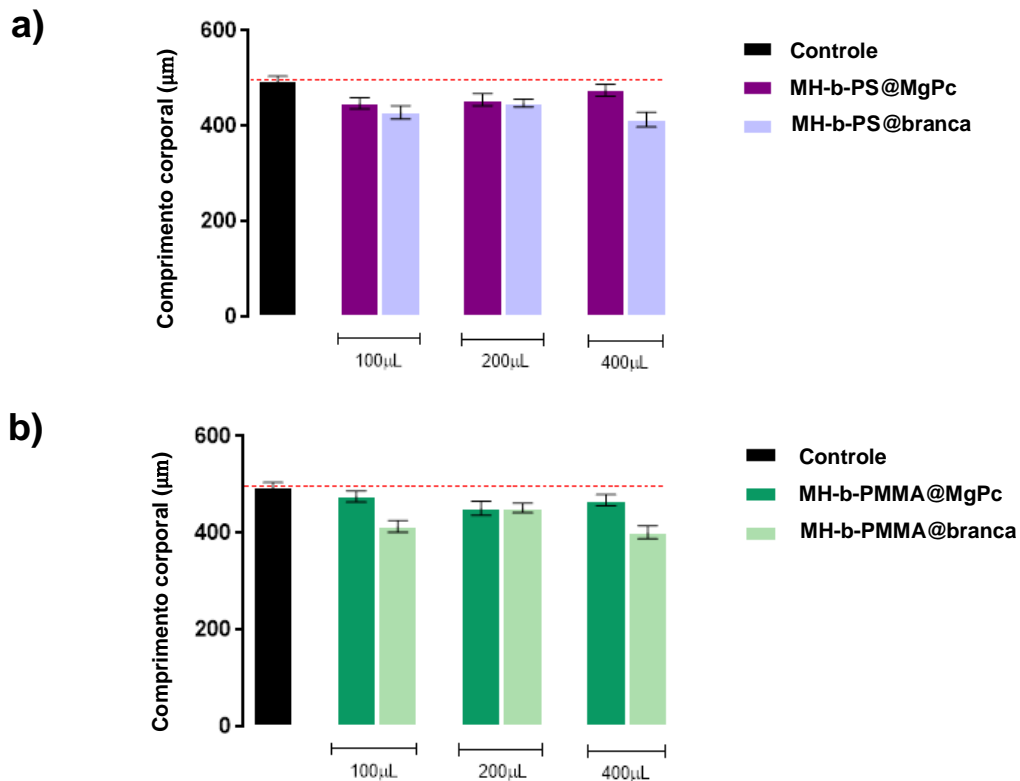
Volume (µL)	NPA/MgPc	NPA	NPB/MgPc	NPB	NPC/MgPc	NPC
100	4,4	5,4	4,9	3,8	3,3	< 3
200	16,7	7,4	6.8	7.4	< 3	3,1
400	18,1	14,4	12.5	11.7	< 3	3,3

5.4.2 Ensaio de desenvolvimento larval

Para complementar os dados de taxa de letalidade e o uso seguro das NPs, foi realizada a análise do desenvolvimento larval dos *C. elegans*. Após exposição aos nanocarreadores o comprimento dos vermes foi medido para avaliar o desenvolvimento larval.

Como observado na Figura 25, a exposição às NPs mostra uma pequena redução do tamanho dos nematódeos. As imagens representativas dos nematódeos expostos à 100, 200 e 400 μL das NPs para análise de desenvolvimento larval são mostradas na Figura 26. Para as nanopartículas NPA e NPB considerando o desvio padrão da medida podemos considerar que ocorreu a mesma redução no desenvolvimento larval para todos os volumes testados. Contudo, para a NPC foi observado uma redução do desenvolvimento larval de maneira volume dependente. Além disso, para a NPA, NPB e NPC e suas respectivas nanopartículas em branco a maior diferença foi observada para o volume de 400 μL (ver Tabela 7), o que pode ser atribuído a uma variabilidade experimental visto que as análises foram realizadas ao longo de 12 dias (um ensaio a cada 4 dias).

Figura 25 – Comprimento dos animais após 48 h de exposição às nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc e MH-b-PS@branca, (b) MH-b-PMMA@MgPc e MH-b-PMMA@branca, e (c) PCL@MgPc e PCL@branca.



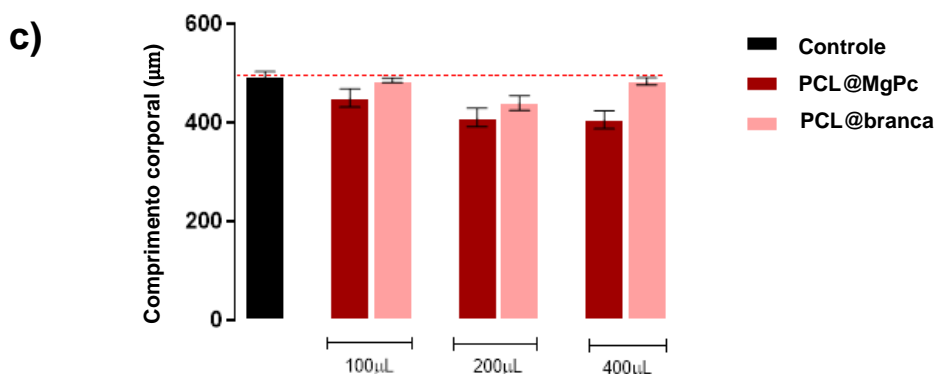
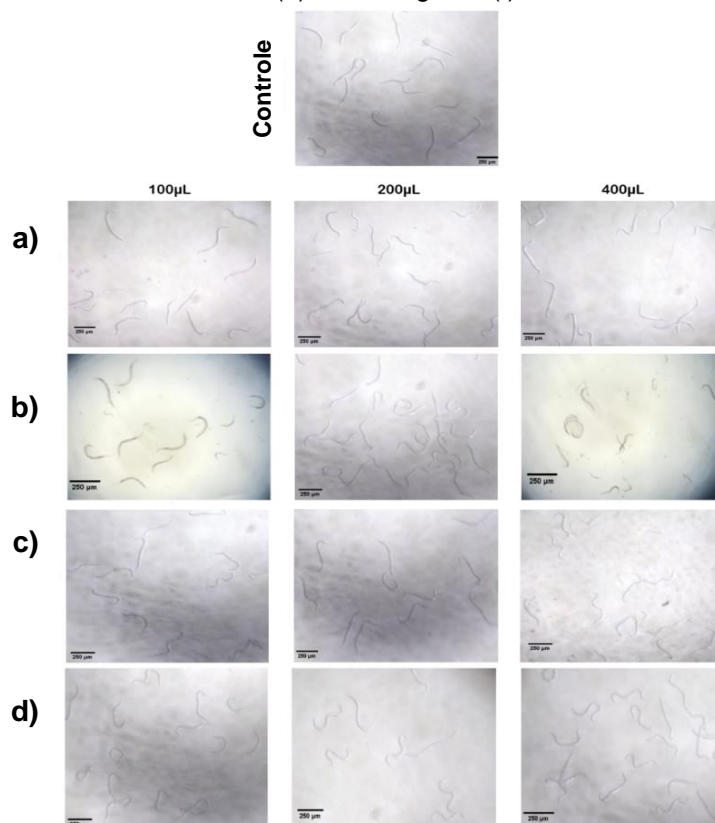
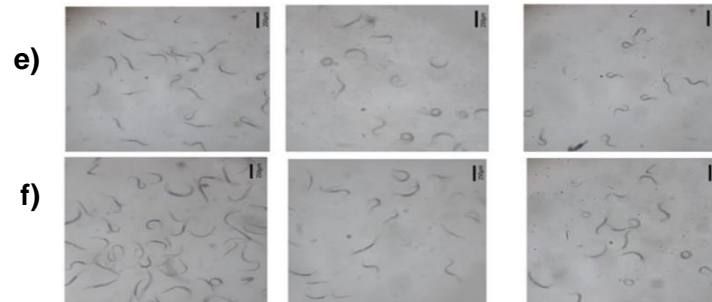


Tabela 7 – Redução do crescimento dos vermes (%) em função do volume utilizado de suspensão de nanopartículas contendo ou não MgPc. Valores em destaque indicam redução de crescimento significativa.

Volume (μL)	NPA/MgPc	NPA	NPB/MgPc	NPB	NPC/MgPc	NPC
100	9.82	13.71	4.27	16.66	9.16	1.95
200	8.31	9.72	9.20	9.03	17.18	11.32
400	4.33	16.73	5.78	19.15	18.09	2.35

Figura 26 – Imagens representativas do comprimento dos nematódeos após 48 h de exposição às nanopartículas (a) MH-b-PS@MgPc, (b) MH-b-PS@branca, (c) MH-b-PMMA@MgPc, (d) MH-b-PMMA@branca, (e) PCL@MgPc e (f) PCL@branca.





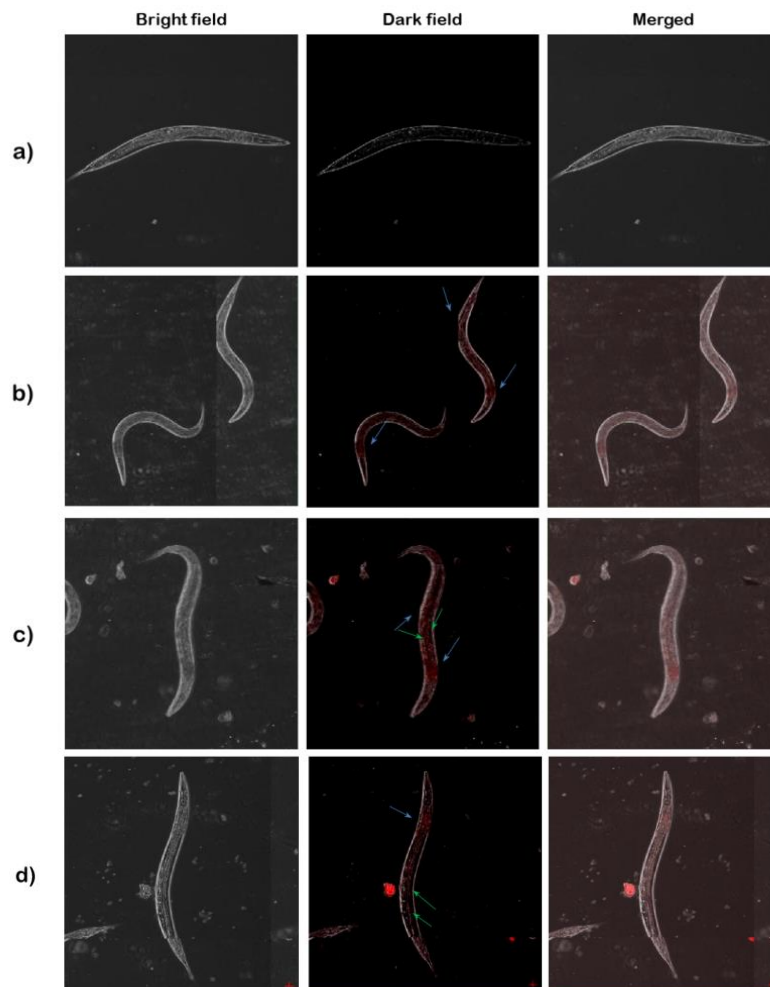
5.4.3 Mapeamento das nanopartículas *in vivo*

Com o objetivo de determinar a ingestão e a biodistribuição das nanopartículas *in vivo*, nematódeos *C. elegans* foram expostos durante uma hora às formulações preparadas (MH-b-PS@MgPc, MH-b-PMMA@MgPc ou PCL@MgPc). Utilizando a técnica de microscopia confocal, pode-se observar fluorescência vermelha predominante nas células circundantes (Figura 27 – flechas azuis), e alguns traços de NPs no bulbo faríngeo e no lúmen intestinal (Figura 27 – flechas verdes). Os resultados obtidos corroboram com estudos prévios encontrados na literatura.

Mohan e colaboradores (2010), utilizando a técnica de microscopia confocal com fluorescência, demonstraram a presença de fluorescência vermelha em áreas similares às observadas no presente trabalho. Já Chen e colaboradores (2011), utilizando nanopartículas com conversão ascendente de fótons (NCAF), e Velasques e colaboradores (2018), utilizando nanopartículas de PCL, identificaram que as NPs contendo compostos emissores de fluorescência verde estavam biodistribuídas nas células circundantes após a ingestão e migração pelo lúmen intestinal.

Os resultados encontrados comprovam que as nanopartículas preparadas são ingeridas com sucesso pelos nematódeos. Pode-se também afirmar que há um processo de biodistribuição das NPs, que passam pelo sistema digestivo dos vermes e se acumulam nos tecidos de células circundantes. Essas informações são de extrema importância para compreender a afinidade das formulações com tecidos e células, bem como as etapas de dispersão das NPs e entrega da substância de interesse em organismos vivos.

Figura 27 – Imagens de microscopia confocal de fluorescência vermelha indicando a biodistribuição das NPs em vermes expostos durante uma hora às amostras de (a) controle, (b) MH-b-PS@MgPc, (c) MH-b-PMMA@MgPc ou (d) PCL@MgPc.



6 CONCLUSÕES

O presente trabalho investigou a encapsulação do fotossensibilizador MgPc em micelas poliméricas de copolímeros em bloco baseados em maltoheptaose (MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc). A título de comparação também foi preparada a nanocápsula de PCL@MgPc. Os resultados obtidos permitem afirmar que as formulações foram preparadas com êxito, e que são termodinamicamente estáveis.

As dispersões coloidais apresentaram adequadas características físico-químicas para emprego na TFD. O tamanho das NPs é condizente com a escala nanométrica, e os baixos índices de polidispersão e altos valores em módulo para o potencial zeta indicam que os sistemas são altamente homogêneos e estáveis ao longo do tempo. Além disso, as micelas poliméricas MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc apresentaram D_h próximo a 100 nm (102 nm e 81 nm, respectivamente), o que é vantajoso quanto à absorção celular. As análises de LUMiSizer mostraram que as formulações a base de MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc são altamente estáveis quando comparadas à formulação a base de PCL@MgPc, e possuem estabilidade física estimada em três anos. Os nanocarreadores apresentaram valores de eficiência acima de 96%, o que permite afirmar que as formulações preparadas são adequadas para a encapsulação do fotossensibilizador hidrofóbico MgPc.

Os resultados da avaliação da fotodegradação do DPBF comprovam que a MgPc encapsulada nas micelas poliméricas (MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc), gera níveis de 1O_2 similares ao encontrado para o FS não encapsulado. Os valores de rendimento quântico de oxigênio singlete são adequados, permitindo evidenciar a potencial aplicação das nanopartículas na TFD.

Os experimentos de liberação *in vitro* da MgPc mostraram que todas as nanopartículas seguem o mesmo modelo cinético. O modelo matemático biexponencial é o que melhor descreve a liberação da MgPc a partir das micelas poliméricas (MH-b-PS@MgPc e MH-b-PMMA@MgPc) e da nanocápsula (PCL@MgPc) pois há liberação do composto em duas etapas com velocidades distintas. A liberação mais rápida da MgPc na fase I para as micelas poliméricas sugere a presença de MgPc na superfície das nanoestruturas.

O estudo de toxicidade demonstrou que as nanopartículas causam uma pequena redução do desenvolvimento larval dos *C. elegans*, mas não induzem letalidade quando os vermes são expostos a baixas concentrações. Além disso, os dados indicam que não há toxicidade associada à MgPc, o que torna o composto promissor quanto à aplicação biológica.

Os resultados de imageamento por microscopia confocal de fluorescência vermelha demonstraram que as NPs são ingeridas pelos nematódeos *C. elegans*, e se biodistribuem no lúmen intestinal e, principalmente, nos tecidos de células circundantes. Essa informação indica que as formulações preparadas são eficazes para entrega de MgPc à tecidos vivos, o que é essencial em aplicações na nanomedicina.

Considerando estes resultados conclui-se que os sistemas nanoestruturados baseados em maltoheptaose preparados nesse trabalho são carreadores promissores para a MgPc. Avaliações complementares são necessárias, mas suas excelentes propriedades físico-químicas, adequada atividade fotodinâmica e cinética de liberação, baixa toxicidade e boa biodistribuição demonstram que as micelas de copolímeros em bloco a base de maltoheptaose contendo MgPc são atrativas e possuem potencial para uso em terapia fotodinâmica.

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74(5), p. 656-669, 2001.
- ALLISON, R. R. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, p. 27-42, 2004.
- ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 7, p. 61-75, 2010.
- ASZIRI, A. M. et al. Preparation and Characterization of Magnesium Phthalocyanines Nanoparticles: Effect of Surfactant on the Shape and Size of Nanoparticles. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**. v. 35, n. 5, p. 1304-1311, 2013.
- ATKINS, P.; PAULA, J. **Físico Química**, v. 2. 8 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2012.
- BACELLAR, I. O. L. Photodynamic efficiency: from molecular photochemistry to cell death. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 16, p. 20523-20559, 2015.
- BAMRUNGSAP, S. et al. Nanotechnology in therapeutics: a focus on nanoparticles as a drug delivery system. **Nanomedicine**, v. 7(8), p. 1253-1271, 2012.
- BARUT, B.; YALÇIN, C. O.; DEMIRBAS, Ü. The water soluble Zn(II) and Mg(II) phthalocyanines: Synthesis, photochemical, DNA photodamage and PDT effects against A549 cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**. v. 405, 2021.
- BONNETT, R.; MARTÍNES, G. Photobleaching of sensitizers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**. v. 57, n. 591, p. 9513-9547, 2001.
- BOSCH, S. et al. Sublethal effects of ionic and nanogold on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of toxicology**, v. 2018, 2018.
- BOWN, S. G. et al. Photodynamic therapy with porphyrin and phthalocyanine sensitisation: quantitative studies in normal rat liver. **British Journal of Cancer**. v. 54, p. 43-52, 1986.
- BARUT, B.; YALÇIN, C. Ö.; DEMIRBAS, Ü. The water soluble Zn(II) and Mg(II) phthalocyanines: Synthesis, photochemical, DNA photodamage and PDT effects against A549 cells. **Journal of Photochemistry & Photobiology, A: Chemistry**. v. 405, p. 112946, 2021.
- CALDAS, B. S. et al. Drug carrier systems made from self-assembled glyconanoparticles of maltoheptaose-b-polyisoprene enhanced the distribution and activity of curcumin against cancer cells. **Journal of Molecular Liquids**, v. 309, p. 113022, 2020.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part two - Cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 2, n. 1, p. 1–23, 2005.

CHEN, J. et al. Controllable synthesis of NaYF₄: Yb,Er upconversion nanophosphors and their application to in vivo imaging of *Caenorhabditis elegans*. **Journal of materials chemistry**, v. 21, i. 8, p. 2632, 2011.

CHEN, K. et al. Hyaluronic acid targeted and pH-responsive nanocarriers based on hollow mesoporous silica nanoparticles for chemo-photodynamic combination therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 194, p. 111166, 2020.

COSTA, P.; LOBO, J. M. S. Modeling and comparison of dissolution profiles. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 13, p. 123–133, 2001.

DĄBROWSKI, J. M. Reactive Oxygen Species in Photodynamic Therapy: Mechanisms of Their Generation and Potentiation. **Advances in Inorganic Chemistry**, v. 70, cap.9, p. 343-394, 2017.

DĄBROWSKI, J. M. et al. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 325, p. 67-101, 2016.

DAI, Y. et al. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. **Chemical Society Reviews**. v. 46, p. 3830–3852, 2017.

DANIELL, M. D.; HILL, J. S. A history of photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v. 61, p. 340-348, 1991.

DE PAULA, C. S. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 371–381, 2013.

DE SOUZA, T, D. et al. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 88-98, 2016.

DIAS, L. D. et al. Curcumin as a photosensitizer: From molecular structure to recent advances in antimicrobial photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 45, 2020.

DOUGHERTY, T. J. Hematoporphyrin as a photosensitizer of tumors. **Photochemistry and Photobiology**. v. 38, p. 377–379, 1983.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic Therapy, **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, 1998.

- EBANI, P. R. et al. Carboxymethyl chitosan/ionic liquid imidazolium-based nanoparticles as nanocarriers for zinc phthalocyanine and its photodynamic activity. **Journal of Molecular Liquids**, v. 336, 2021.
- EL-KHOULY, M. E. et al. Intermolecular and supramolecular photoinduced electron transfer processes of fullerene–porphyrin/phthalocyanine systems. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 5, p. 79-104, 2004.
- FINSEN, N. R. Remarks on the red-light treatment of small-pox. **The British Medical Journal**, p. 1297-1298, 6 jun. 1903.
- GOBO, N. R. S. **Estratégias sintéticas para a preparação de novos fotossensibilizadores do tipo ftalocianinas**. Dissertação (Mestrado em QUÍMICA)-Universidade Federal de São Carlos. São Carlos. 2013.
- HADJUR, C. et al. Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 45, n. 2–3, p. 170–178, 1998.
- HERATH, H. M. A. et al. Synthesis, characterization and photochemistry of 5,10,15,20-tetrakis (4-N-pentylpyridyl) porphyrins, [(TPePyP)H₂]⁴⁺ and [(TPePyP)ZnII]⁴⁺. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**. v. 9, p. 155-162. 2005.
- HU, C. et al. Toxic effects of size-tunable gold nanoparticles on *Caenorhabditis elegans* development and gene regulation. *Scientific reports*, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2018.
- JIN, C. S.; ZHENG, G. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 43, n. 7, p. 734–748, 2011.
- KATA, S. G. et al. Photodynamic diagnostic ureterorenoscopy: A valuable tool in the detection of upper urinary tract tumour. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v.13, p. 255-260. 2016.
- KIM, K. H., PARK, J. J. The effects of photodynamic therapy in upper-gastrointestinal malignant diseases. **Gut and liver**, v. 4, p. S39–S43, 2010.
- KULKARNI, S.A.; Feng, S.S. Effects of Particle Size and Surface Modification on Cellular Uptake and Biodistribution of Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery. **Pharmaceutical Resolution**. n. 30, p. 2512–2522, 2013.
- KUZNETSOVA, N. et al. Relationship between the photochemical properties and structure of pophyrins and related compounds. **Russian Journal of General Chemistry**. v. 70, p. 133-140, 2000.
- LAMCH, Ł. et al. Preparation and characterization of new zinc(II) phthalocyanine - Containing poly(l-lactide)-b-poly(ethylene glycol) copolymer micelles for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 185–197, 2016.

LAMCH, Ł. et al. Folate-directed zinc (II) phthalocyanine loaded polymeric micelles engineered to generate reactive oxygen species for efficacious photodynamic therapy of cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, n. January, p. 480–491, 2019.

LAMMERS, T. et al. Drug targeting to tumors: Principles, pitfalls and (pre-) clinical progress. **Journal of Controlled Release**. v. 161, p. 175-187, 2012.

ŁAPOK, L. et al. Synthesis, spectroscopic properties and interaction with a liposomal membrane of a novel iodinated magnesium phthalocyanine. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 286, p. 55-63, 2014.

LERCHE, D. Dispersion stability and particle characterization by sedimentation kinetics in a centrifugal field. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 23, n. 5, p. 699-709, 2002.

LI, S. et al. Conjugated Conjugated-Polymer-Based Red-Emitting Nanoparticles for TwoPhoton Excitation Cell Imaging with High Contrast. **Langmuir**. v. 30, p. 7623-7627, 2014.

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

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

LIM, C. K. et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. **Cancer Letters**. v. 334, p. 176–187, 2013.

LIU, H. et al. Halogenated cyanine dyes for synergistic photodynamic and photothermal therapy. **Dyes and Pigments**, v. 190, 2021

LU, X. et al. Exploration of photophysical and photochemical properties of Zinc phthalocyanine-loaded SDC/TPGS mixed micelles. **Chemical Physics Letters**, v. 735, 16 nov. 2019.

MASTER, A. M. et al. EGFR-mediated intracellular delivery of Pc 4 nanoformulation for targeted photodynamic therapy of cancer: in vitro studies. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**. v. 8, p. 655–664, 2012.

MCDONAGH, A. F. Phototherapy: From Ancient Egypt to the New Millennium. **Journal of Perinatology**, v. 21, p. S7-S12, 2001.

MFOUO-TYNGA, I. S. et al. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 34, 2021.

MOHAN, N. et al. In vivo imaging and toxicity assessments of fluorescent nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. **Nano letters**. v. 10, i. 9, 2010.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymerbased nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**. Jan. 2010.

PARK, H. H.; JUNG, Y.; LEE, S. V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and cells**, v. 40, n. 2, p. 90, 2017.

POUND-LANA, G. E. N. et al. Phthalocyanine photosensitizer in polyethylene glycolblock-poly(lactide-co-benzyl glycidyl ether) nanocarriers: probing the contribution of aromatic donor-acceptor interactions in polymeric nanospheres. **Materials Science & Engineering C**. v. 94, p. 220-233, 2019.

OTSUKA, I. et al. Self-Assembly of Maltoheptaose-block-Polystyrene into Micellar Nanoparticles and Encapsulation of Gold Nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, p. 15224-15230, 2013.

RAILKAR, R.; AGARWAL, P. K. Photodynamic Therapy in the Treatment of Bladder Cancer: Past Challenges and Current Innovations. **European Urology Focus**. v. 4, i. 4, p. 509-5011, 2018.

RAK et al. Drug Delivery Systems for Phthalocyanines for Photodynamic Therapy. **Anticancer Research**, v. 39, p. 3323-3339, 2019.

ROMERO, M. P. et al. Photophysical properties and photodynamic activity of a novel menthol-zinc phthalocyanine conjugate incorporated in micelles. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 253, p. 22–29, 1 fev. 2013.

ROUVIERE, J. et al. Propriétés physico-chimiques de n-alkyl p-benzène sulfonates alcalins: température de Krafft et concentration critique micellaire. **Journal de Chimie Physique**. v. 80, p. 309–314, 1983

SETARO, F. et al. Amphiphilic phthalocyanines in polymeric micelles: A supramolecular approach toward efficient third-generation photosensitizers. **Journal of Materials Chemistry B**. v. 8, n. 2, p. 282–289, 2020.

SOBISCH, T.; LERCHE, D. Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 331, n. 1-2, p. 114-118, 2008.

SHANMUGAPRIYA, K.; KANG, H. W. Engineering pharmaceutical nanocarriers for photodynamic therapy on wound healing: Review. **Materials Science & Engineering C**, v. 105, Dec. 2019.

SHAO, J. et al. The role of FOS-mediated autophagy activation in the indocyanine green-based photodynamic therapy for treating melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 214, p. 112101, 2021.

SHIPUNOVA, V. O. et al. Targeting Cancer Cell Tight Junctions Enhances PLGA-Based Photothermal Sensitizers' Performance In Vitro and In Vivo. **Pharmaceutics**. v. 14 (1), 43, 2022.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 48, p. 139-157, 2001.

SILVA, C. et al. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, p. 371-381, 2013.

SZTANDERA, K. et al. Sugar Modification Enhances Cytotoxic Activity of PAMAM-Doxorubicin Conjugate in Glucose-Deprived MCF-7 Cells—Possible Role of GLUT1 Transporter. **Pharmaceutical Research**. v. 36, n. 140, 2019.

TOLEDANO, M. et al. Novel Polymeric Nanocarriers Reduced Zinc and Doxycycline Toxicity in the Nematode *Caenorhabditis elegans*. **Antioxidants**, v. 8, n. 11, p. 550, 2019.

VELASQUES, K. et al. Co-nanoencapsulation of antimalarial drugs increases their in vitro efficacy against *Plasmodium falciparum* and decreases their toxicity to *Caenorhabditis elegans*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 118, 2018.

VILLETTI, M. A. et al. Design and Characterization of Maltoheptaose- b –Polystyrene Nanoparticles, as a Potential New Nanocarrier for Oral Delivery of Tamoxifen. **Molecules**. p. 1–16, 2021.

VILSINSKI, B. H. et al. Formulation of chloroaluminum phthalocyanine incorporated into PS-b-PAA diblock copolymer nanomicelles. **Journal of Molecular Liquids**, v. 271, p. 949-958, 2018.

WU, T. et al. *Caenorhabditis elegans* as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles. **Chemosphere**, v. 221, p. 708–726, 2019.

YANO, S. et al. Current states and future views in photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews**, v. 12, p. 46-67, 2011.

ZEPON, K. M. et al. Glyco-Nanoparticles Made from Self-Assembly of Maltoheptaoseblock- Poly(methyl methacrylate): Micelle, Reverse Micelle, and Encapsulation. **Biomacromolecules**. v. 16, p. 2012–2024, 2015.

ZEPON, K. M. et al. Self-Assembly of Oligosaccharide-b-PMMA Block Copolymer Systems: Glyco-Nanoparticles and Their Degradation under UV Exposure. **Langmuir**. v. 32, p. 4538–4545, 2016.

ZENG, K.; et al. J. GLUT1/3/4 as novel biomarkers for the prognosis of human breast cancer. **Translational Cancer Research**. v. 9, p. 2363-2377, 2020.

ZEČÍČET, A.; DHONDT, I.; BRAECKMAN, B. P. The nutritional requirements of *Caenorhabditis elegans*. **Genes & Nutrition**. v. 14:15, 2019.

ZHANG, X. F.; LI, X. The photostability and fluorescence properties of diphenylisobenzofuran. **Journal of Luminescence**, v. 131, n. 11, p. 2263–2266, nov. 2011.

ZHONG, Y. et al. Hierarchical dual-responsive cleavable nanosystem for synergetic photodynamic/photothermal therapy against melanoma. **Materials Science and Engineering: C**. p. 112524, 2021.

ZHOU, Y. et al. A real-time documentation and mechanistic investigation of quantum dots-induced autophagy in live *Caenorhabditis elegans*. **Biomaterials**, v. 72, p. 38-48, 2015.

APÊNDICE A – ESPECTROS DE DLS E POTENCIAL ZETA PARA AS NANOPARTÍCULAS EM BRANCO

Figura A1 – Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico para a nanopartícula NPA branca.

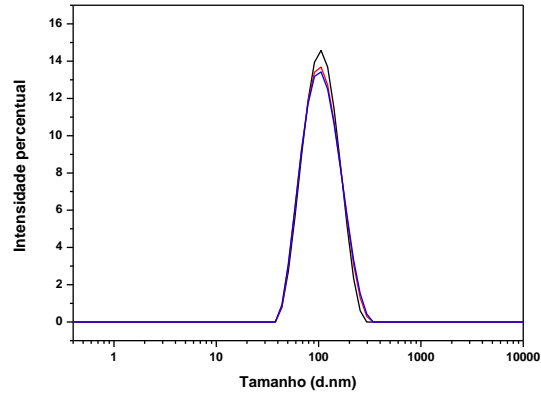


Figura A2 – Contagens totais versus o potencial zeta para nanopartícula NPA branca.

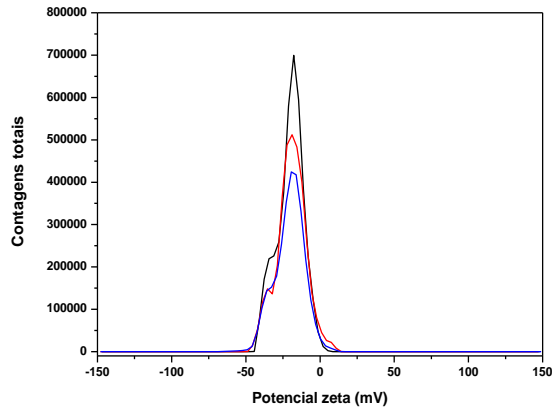


Figura A3 – Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico para a nanopartícula NPB branca.

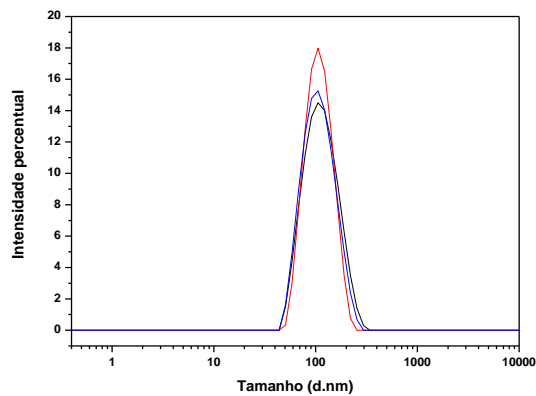
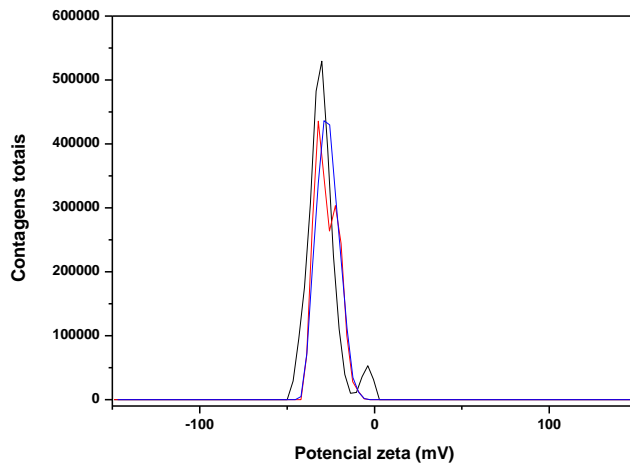
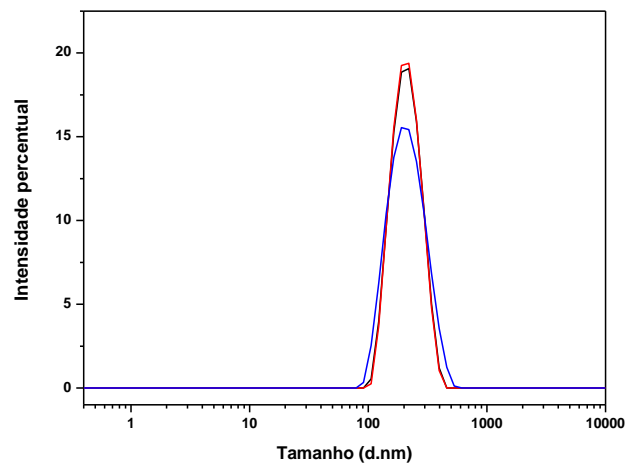
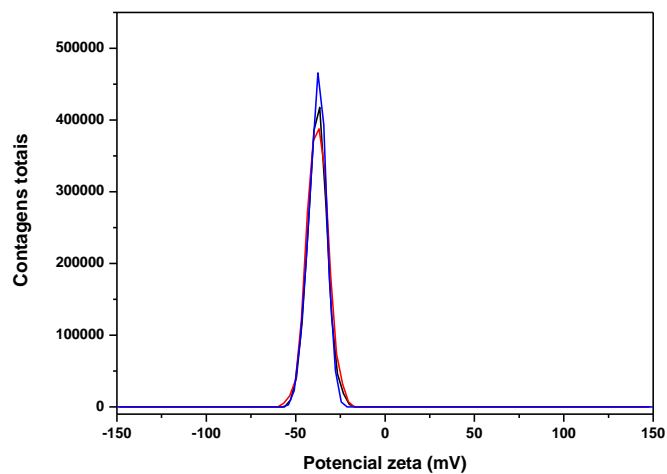


Figura A4 – Contagens totais *versus* o potencial zeta para nanopartícula NPB branca.Figura A5 – Intensidade de luz espalhada $I(q)$ *versus* diâmetro hidrodinâmico para a nanopartícula NPC branca.Figura A6 – Contagens totais *versus* o potencial zeta para nanopartícula NPC branca.

APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO E TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAMENTO

Figura B1 – Gráfico de intensidade *versus* comprimento de onda para a curva de calibração da MgPc em DMF.

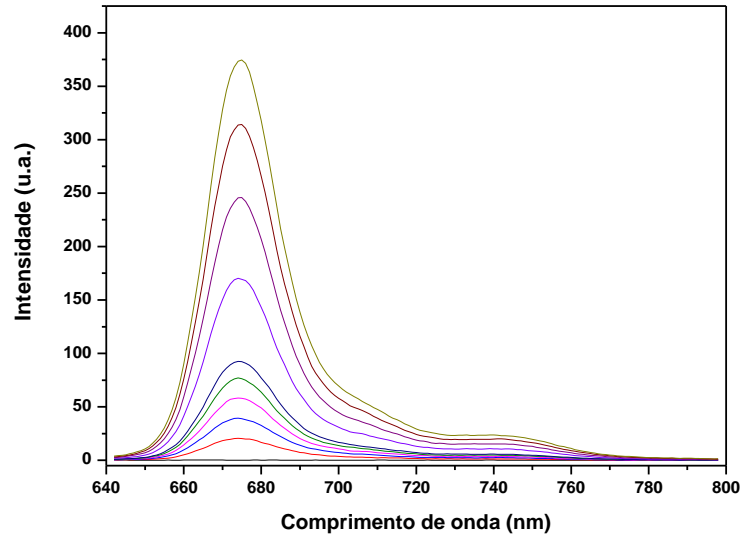


Figura B2 – Gráfico de intensidade *versus* concentração para a curva de calibração da MgPc em DMF (média com desvio padrão).

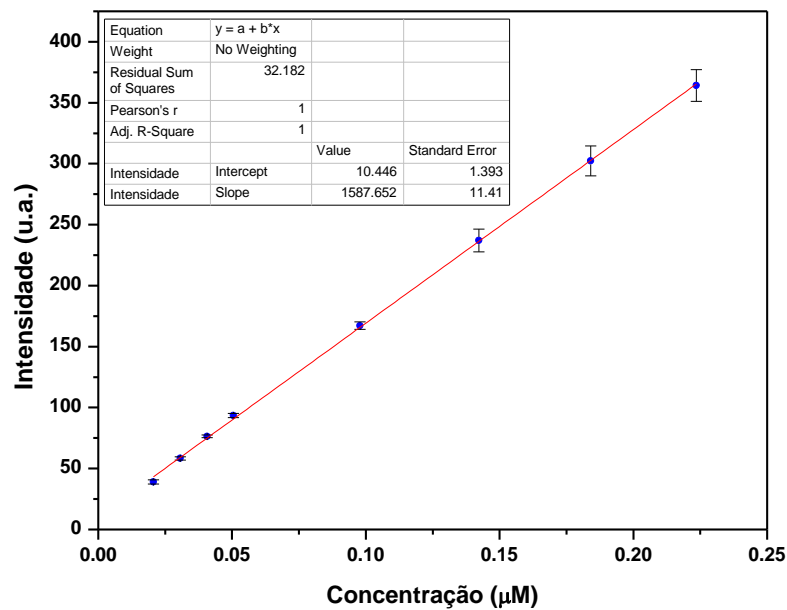


Figura B3 – Gráficos de intensidade *versus* comprimento de onda para as análises em triplicata de (a) teor total de MgPc e (b) teor de MgPc livre, para as nanopartículas NPA.

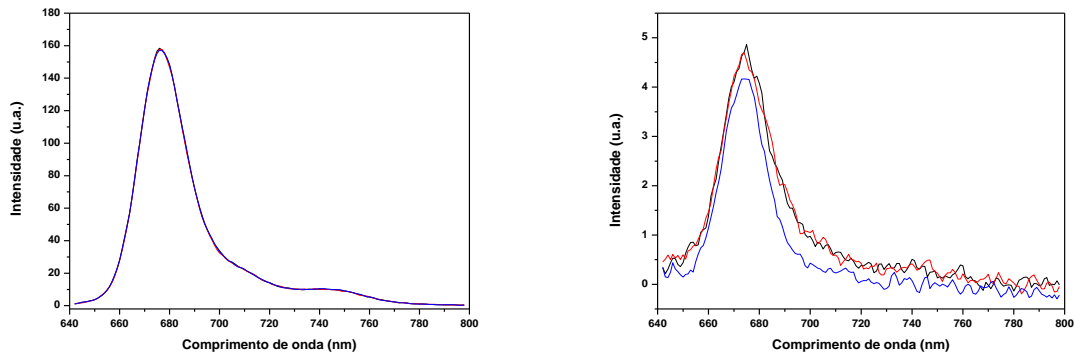


Figura B4 – Gráficos de intensidade *versus* comprimento de onda para as análises em triplicata de (a) teor total de MgPc e (b) teor de MgPc livre, para as nanopartículas NPB.

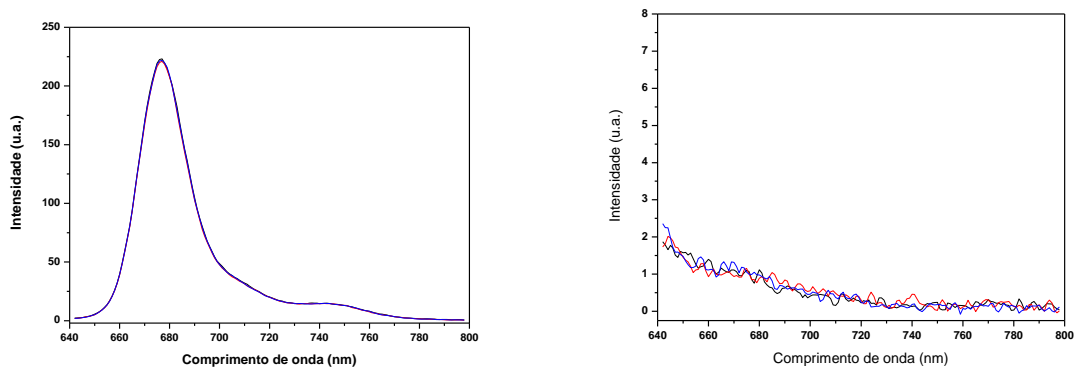
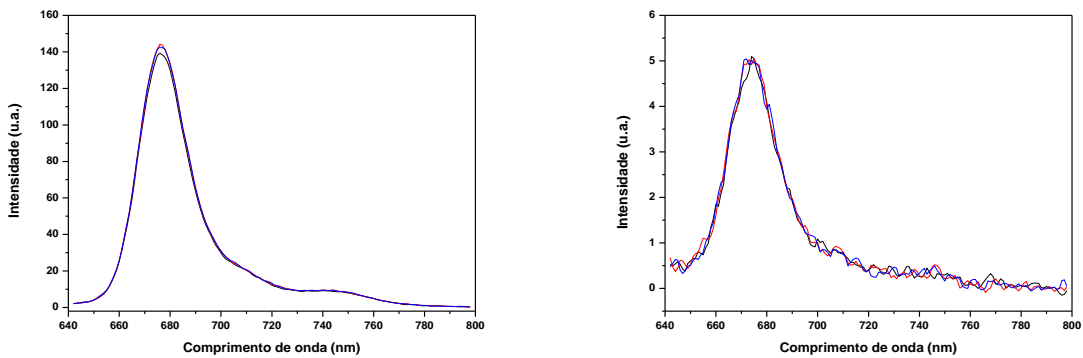


Figura B5 – Gráficos de intensidade *versus* comprimento de onda para as análises em triplicata de (a) teor total de MgPc e (b) teor de MgPc livre, para as nanopartículas NPC.



APÊNDICE C – TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE FOTODEGRADAÇÃO DO DPBF

Figura C1 – Fotodegradação do DPBF na presença da ZnPc livre.

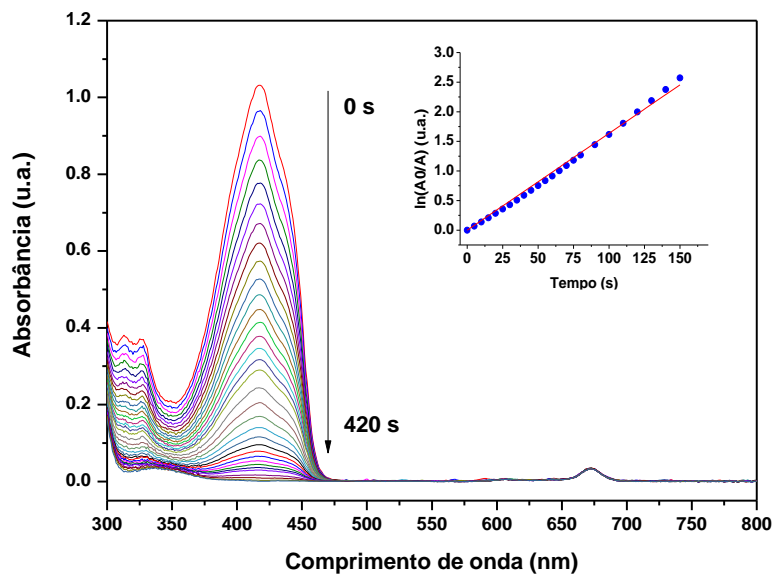


Figura C2 – Fotodegradação do DPBF na presença da ZnPc livre (duplicata).

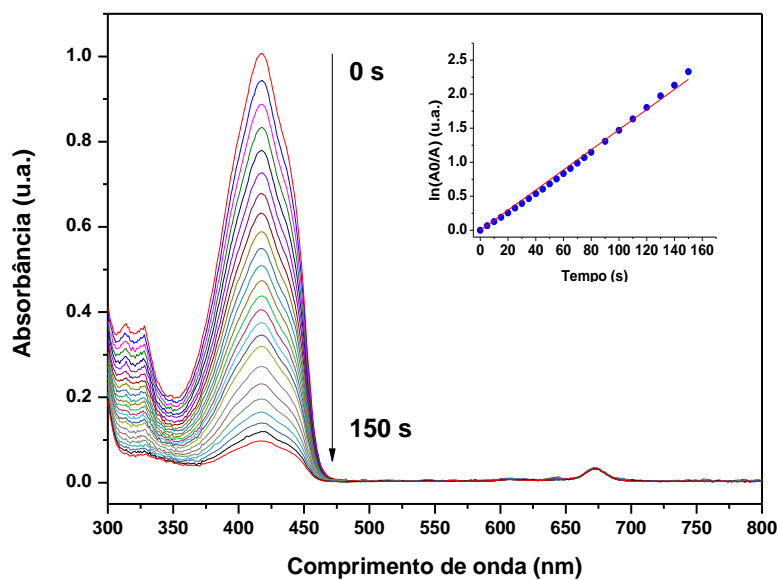


Figura C3 – Fotodegradação do DPBF na presença da ZnPc livre (triplicata).

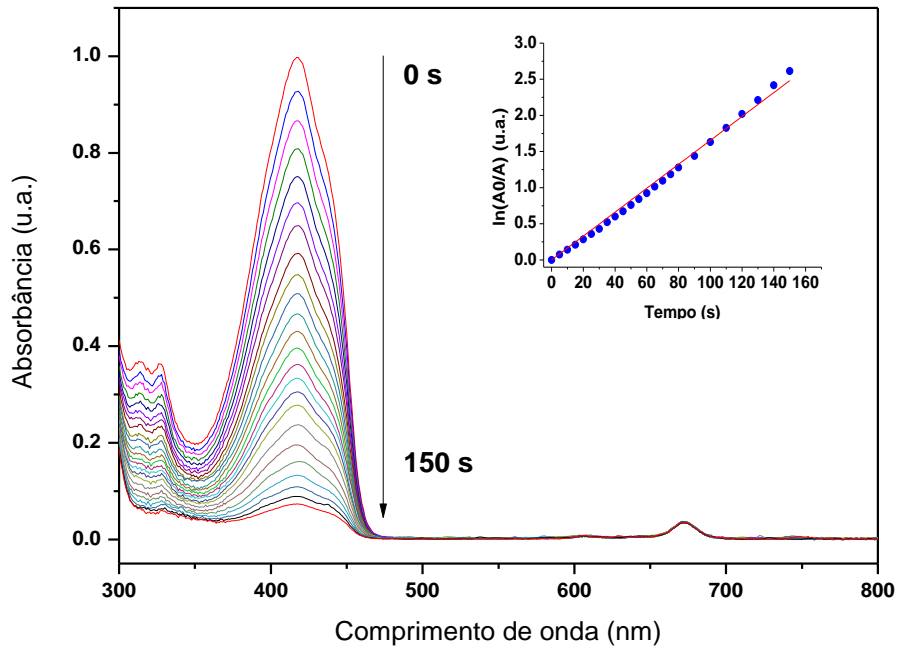
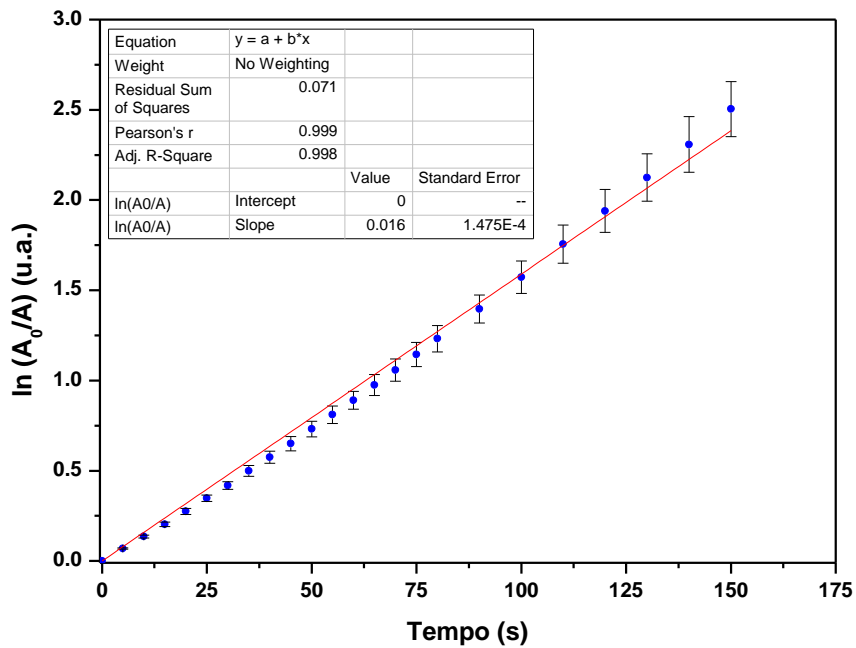
Figura C4 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da ZnPc livre (média com desvio padrão).

Figura C5 – Fotodegradação do DPBF na presença da MgPc livre (duplicata).

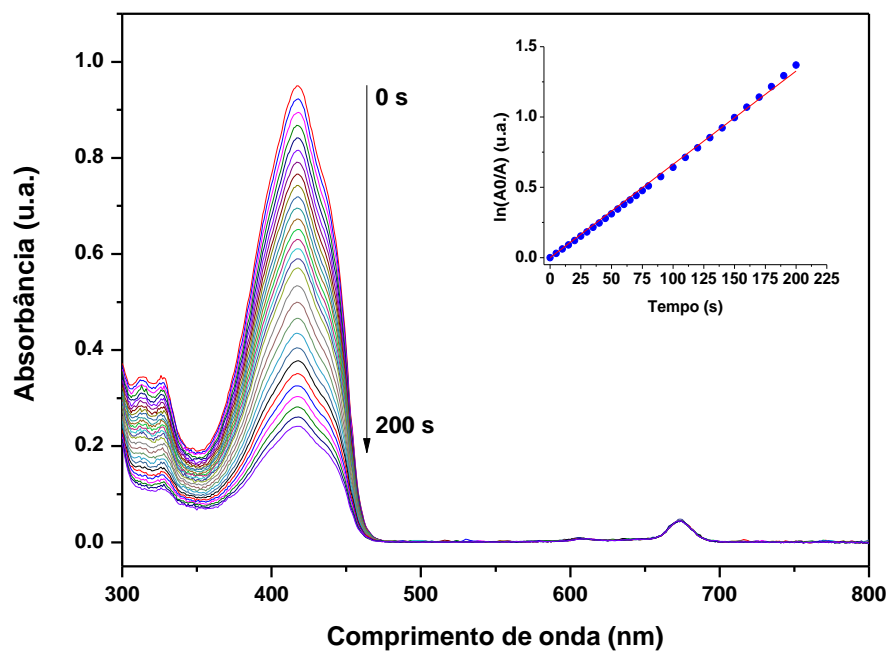


Figura C6 – Fotodegradação do DPBF na presença da MgPc livre (triplicata).

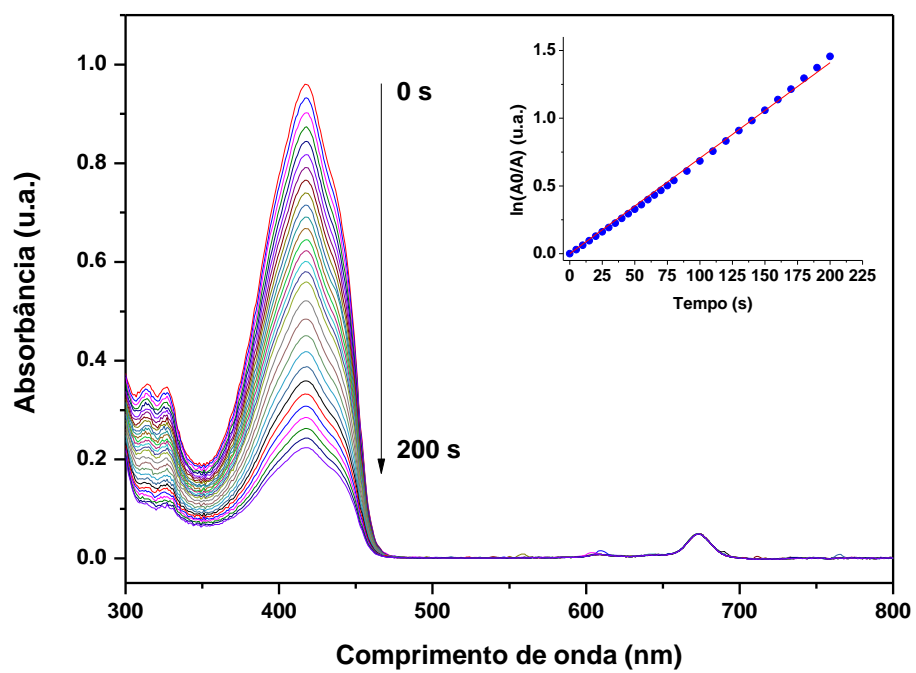


Figura C7 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da MgPc livre (média com desvio padrão).

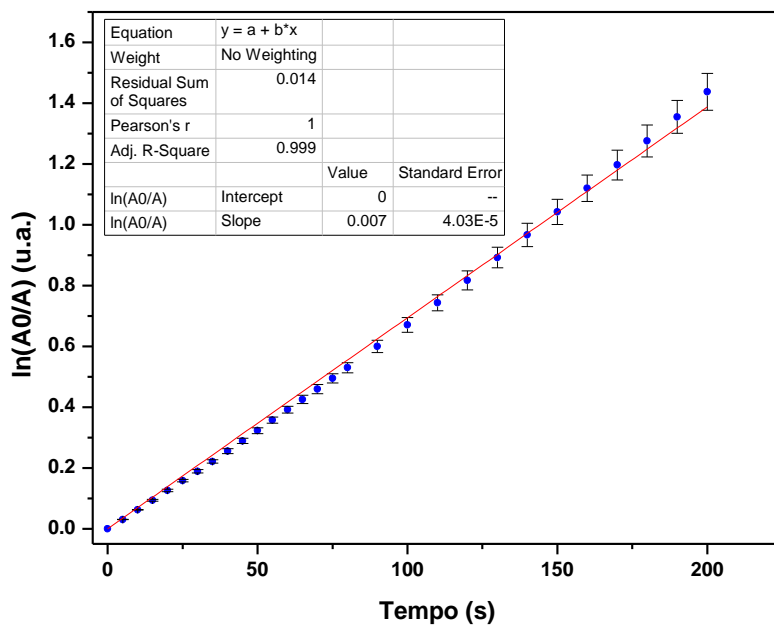


Figura C8 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPA (duplicata).

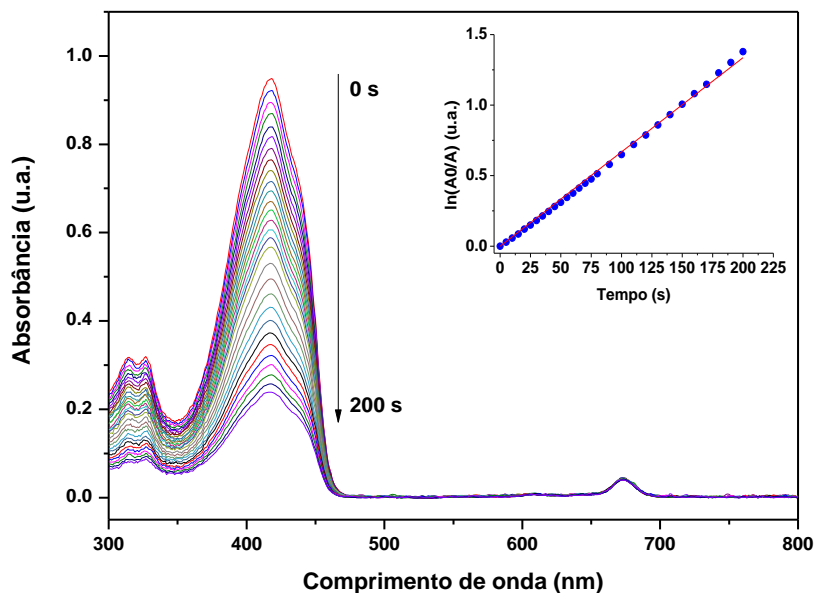


Figura C9 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPA (triplicata).

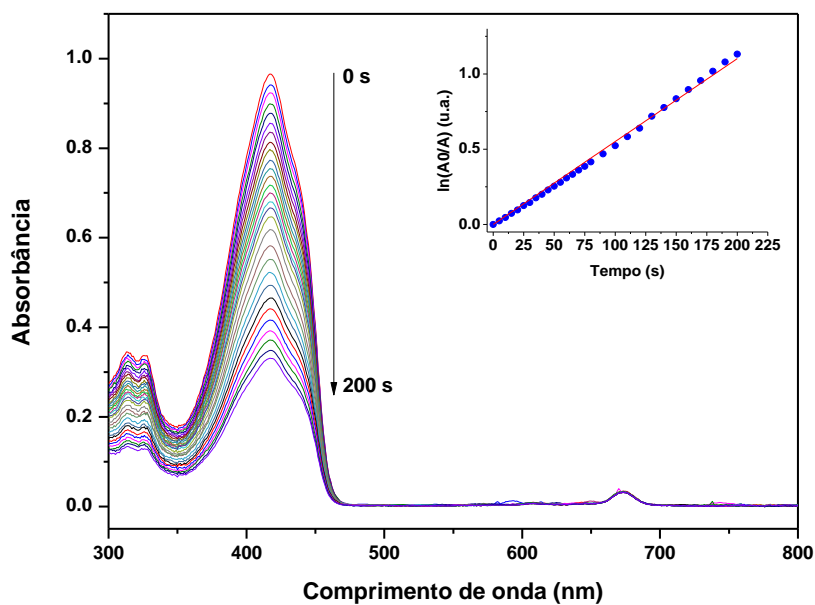
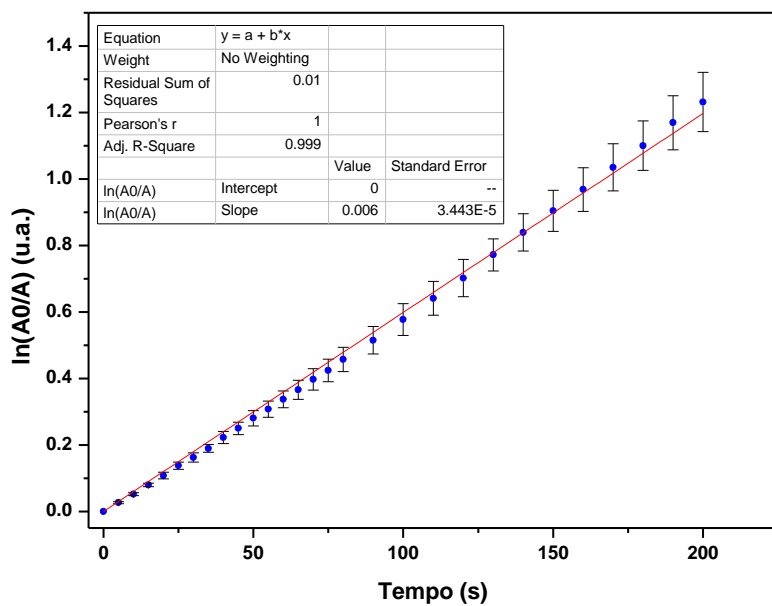
Figura C10 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da NPA (média com desvio padrão).

Figura C11 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPB (duplicata).

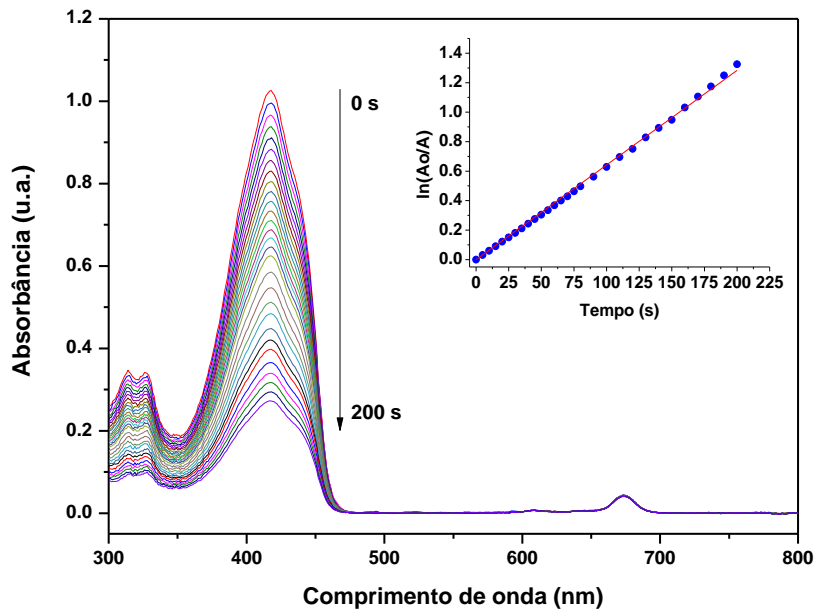


Figura C12 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPB (triplicata).

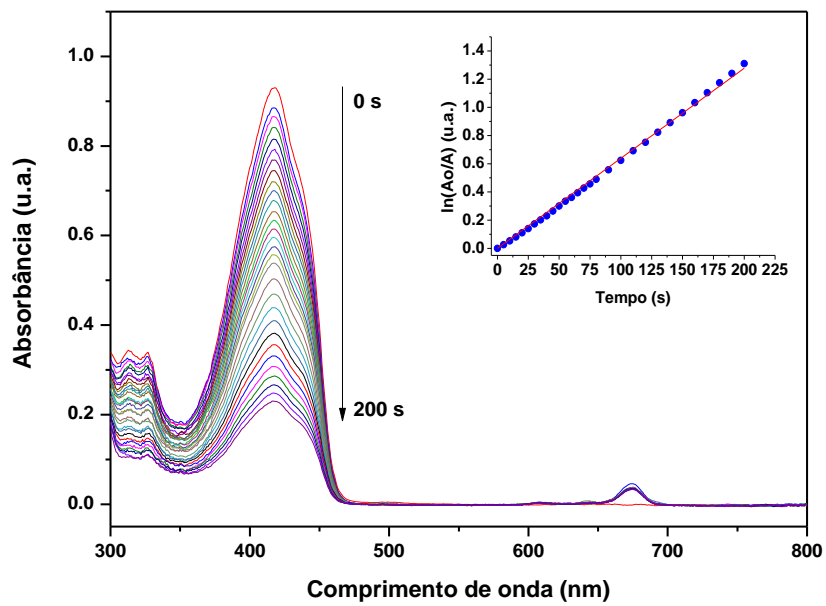


Figura C13 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da NPB (média com desvio padrão).

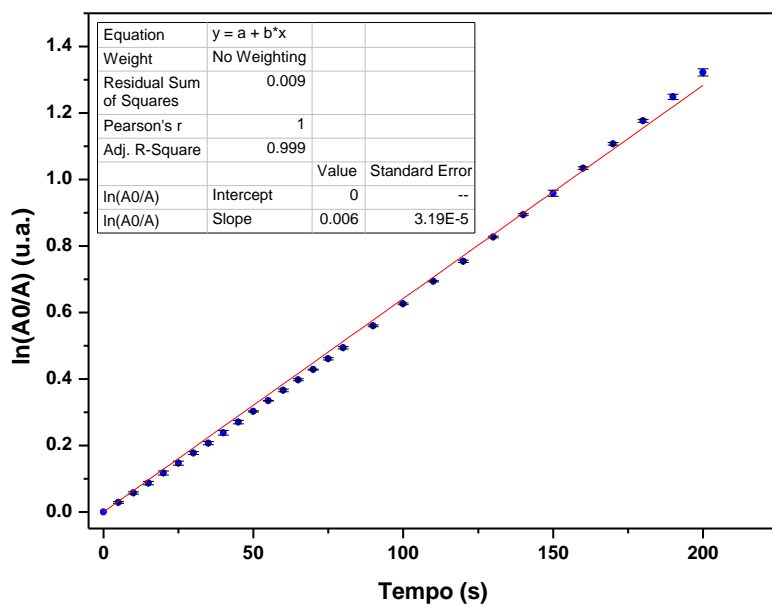


Figura C14 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPC (duplicata).

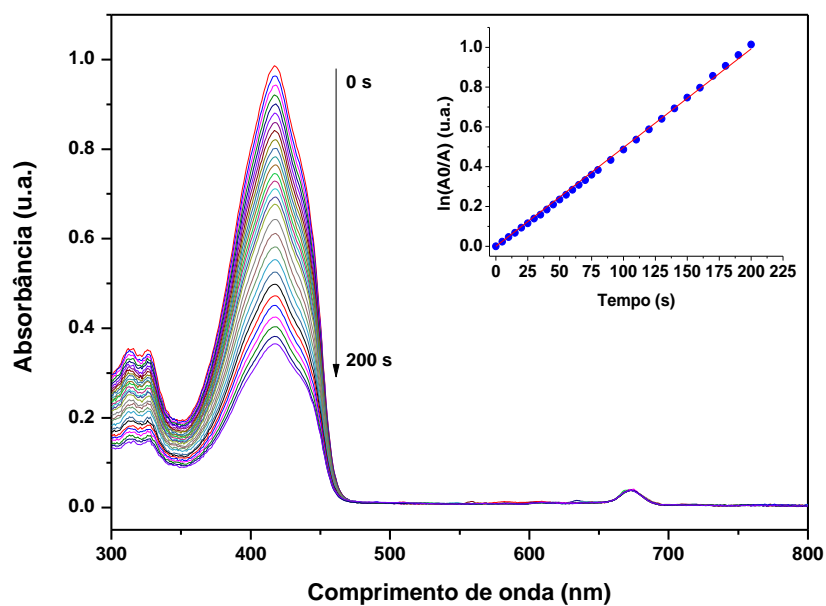
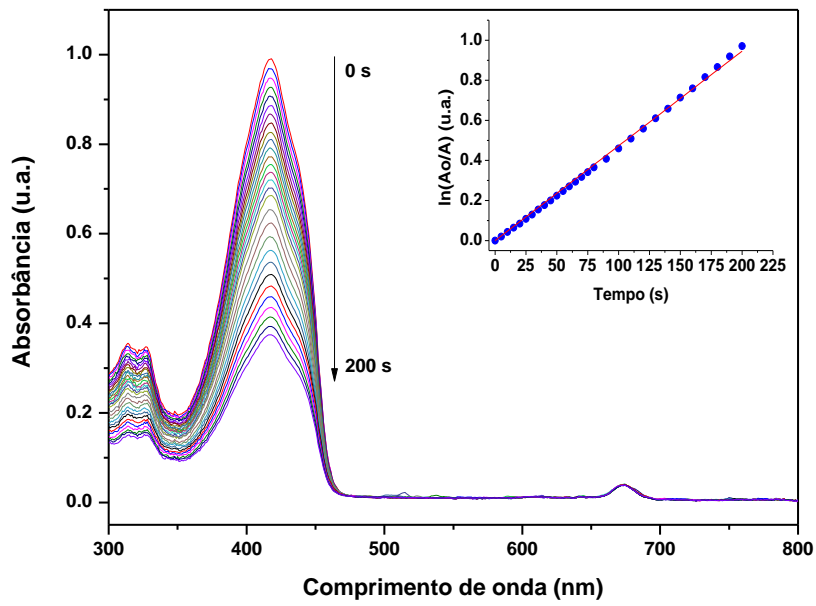
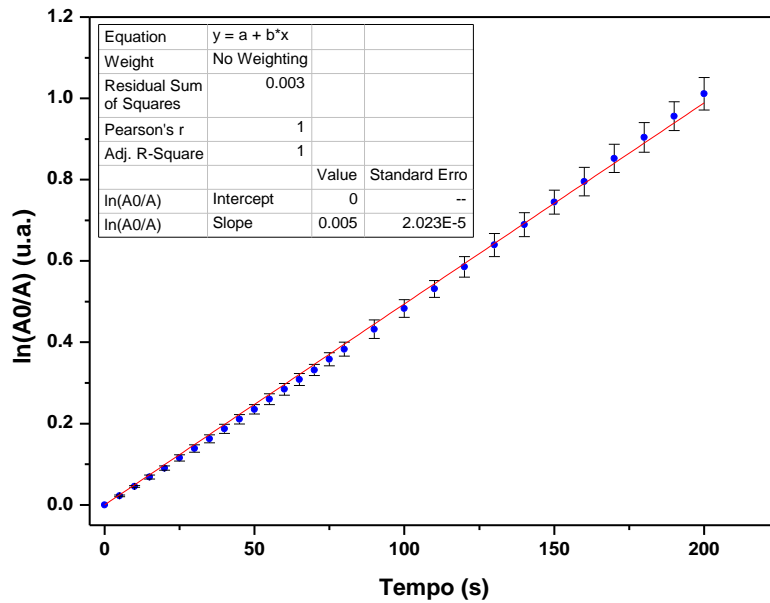


Figura C15 – Fotodegradação do DPBF na presença da NPC (triplicata).

Figura C16 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da NPC (média com desvio padrão).

APÊNDICE D – CURVA DE CALIBRAÇÃO E TRIPLICATA DA ANÁLISE DE CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

Figura D1 – Gráfico de intensidade *versus* comprimento de onda para a curva de calibração da MgPc em tampão/DMF.

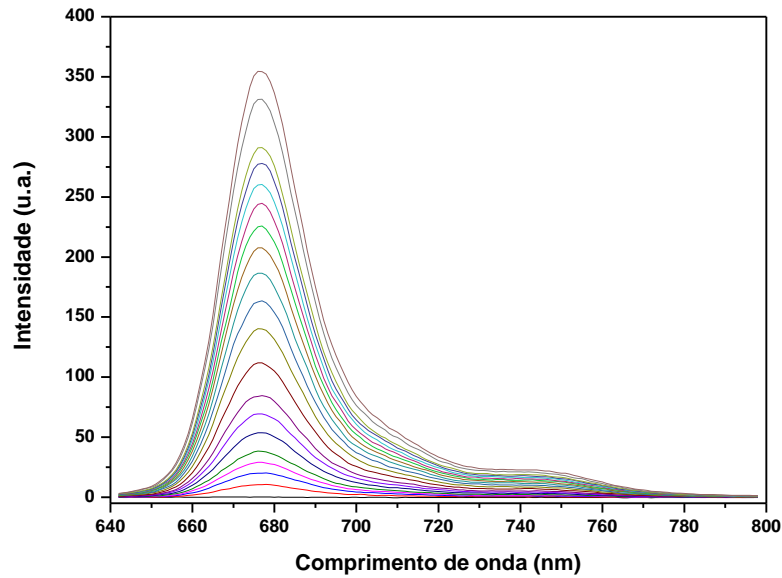


Figura D2 – Gráfico de intensidade *versus* concentração para a curva de calibração da MgPc em tampão/DMF (média com desvio padrão).

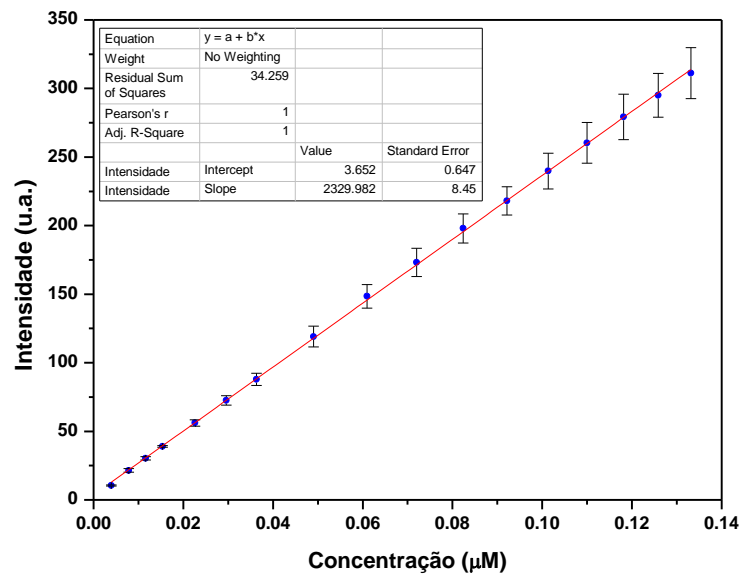


Figura D3 – Intensidade *versus* comprimento de onda, para a análise de cinética de liberação *in vitro* do sistema MH-b-PS@MgPc.

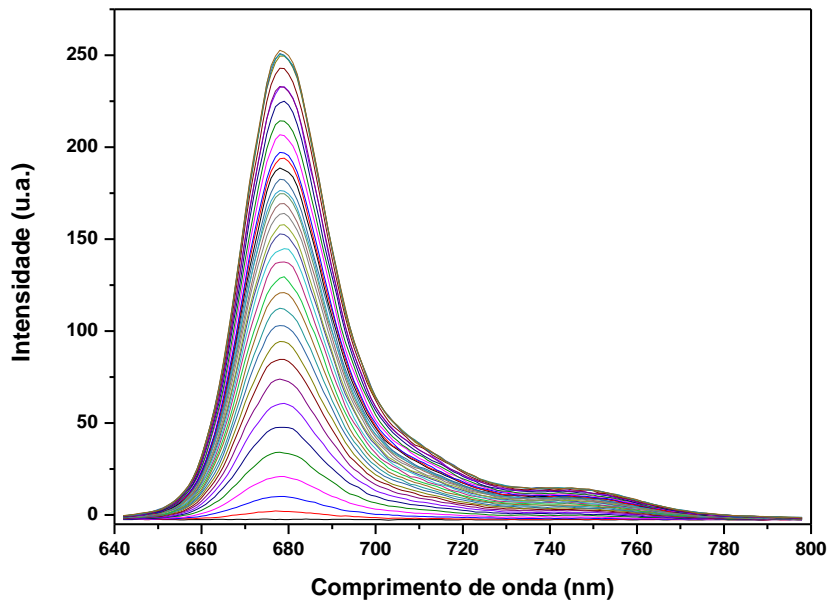


Figura D4 – Intensidade *versus* comprimento de onda, para a análise de cinética de liberação *in vitro* do sistema MH-b-PMMA@MgPc.

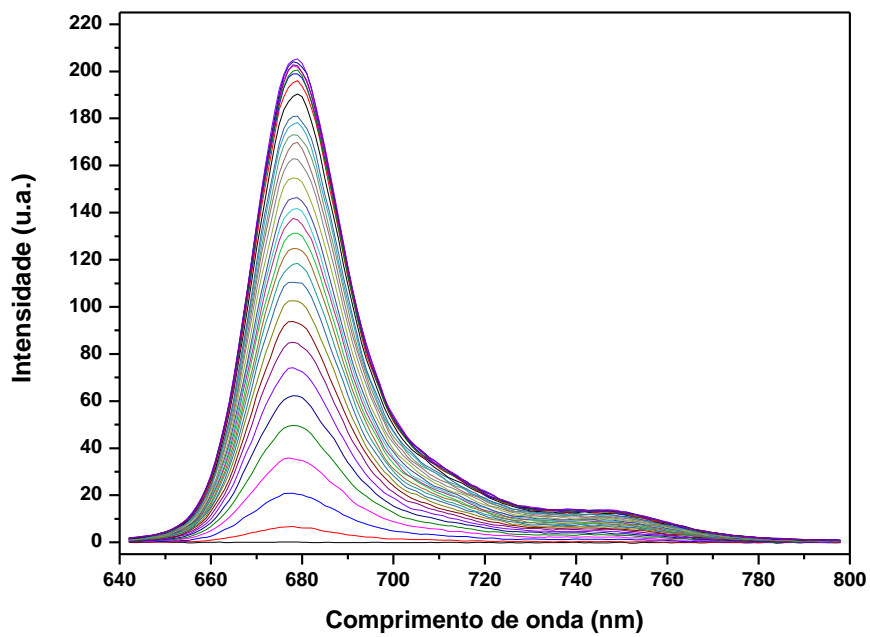


Figura D5 – Intensidade versus comprimento de onda, para a análise de cinética de liberação *in vitro* do sistema PCL@MgPc.

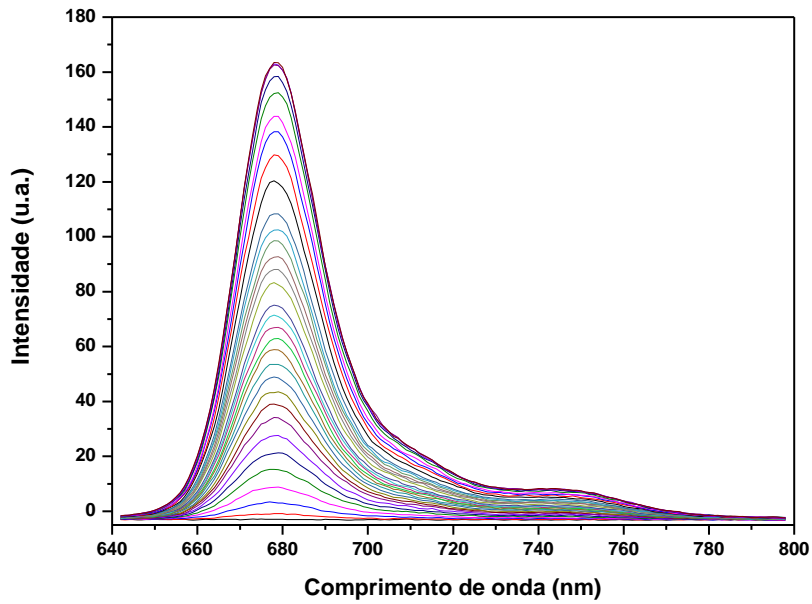


Tabela D1 - Constantes cinéticas de liberação de MgPc (k) e coeficiente de determinação (R²) para os seis modelos matemáticos utilizados para avaliar o perfil cinético de liberação da MgPc.

	Ordem zero		1ª ordem		Modelo de Higuchi		Modelo Biexponencial			Modelo de Korsmeyer Peppas			Modelo de Hixson Crowell	
	k	R ²	k	R ²	k	R ²	k ₁	k ₂	R ²	n	k	R ²	k	R ²
							a	b						
MH-b-PS @MgPc	0,198	0,678	0,5 . 10 ⁻²	0,376	5,185	0,863	1,48 . 10 ⁻²	5,9 . 10 ⁻⁴	0,9995	6,83	0,449	0,937	0,5 . 10 ⁻²	0,494
0,93							0,18							
MH-b-PMMA @MgPc	0,122	0,735	0,5 . 10 ⁻²	0,391	2,916	0,915	1,54 . 10 ⁻²	3,2 . 10 ⁻⁵	0,9999	3,585	0,477	0,961	0,4 . 10 ⁻²	0,598
0,49							0,53							
PCL @MgPc	0,168	0,834	0,6 . 10 ⁻²	0,517	4,177	0,963	8,16 . 10 ⁻³	1,18 . 10 ⁻⁴	0,999	1,82	0,614	0,968	0,7 . 10 ⁻²	0,559
0,709							0,350							