

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

Luiza Bertoldo Stefanello

**NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO EM BLOCO DE
MALTOHEPTAOSE-B-POLIMETILMETACRILATO CONTENDO
FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO PARA O USO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA**

**Santa Maria, RS
2022**

Luiza Bertoldo Stefanello

**NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO EM BLOCO DE
MALTOHEPTAOSE-B-POLIMETILMETACRILATO CONTENDO
FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO PARA O USO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA**

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

Orientador: Prof^o Dr. Marcos Antônio Villetti

Santa Maria, RS
2022

Stefanello, Luiza
NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO EM BLOCO DE
MALTOHEPTAOSE-B-POLIMETILMETACRILATO CONTENDO
FTALOCIANINA DE CLOROALUMÍNIO PARA O USO EM TERAPIA
FOTODINÂMICA / Luiza
Stefanello.- 2022.
94 p.; 30 cm

Orientador: Marcos Antonio Villetti
Coorientador: Bernardo Almeida Iglesias
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de
Pós-Graduação em Química, RS, 2022

1. Nanocarreadores 2. Terapia Fotodinâmica 3.
Fotossensibilizadores de Terceira Geração 4. Ftalocianina
de Cloro-Alumínio I. Villetti, Marcos Antonio II. Almeida
Iglesias, Bernardo III. 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, LUIZA STEFANELLO, 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.

Luiza Bertoldo Stefanello

NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO EM BLOCO DE MALTOHEPTAOSE-B-POLIMETILMETACRILATO CONTENDO FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO PARA O USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

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

Aprovada em 09 de agosto de 2022:

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

Cezar Augusto Bizzi, Dr (UFSM)

Irene Teresinha Santos Garcia, Dra (UFRGS)

Santa Maria, RS
2022

AGRADECIMENTOS

Em especial aos meus pais, padrinhos e avós maternos, pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida e pela motivação de sempre seguir em frente.

Ao professor Marcos Villetti, por aceitar me orientar e me acompanhar nesta trajetória, obrigada pelos momentos de troca de conhecimento, conselhos e orientações.

Ao LEPOL/UFSM, por me acolher e proporcionar a oportunidade de realização do mestrado. À professor Carmen Kloster, às ICs Edileuza Teixeira e Brenda Bopp e à colega Lia Matiazzi, por toda a ajuda e pelas trocas durante o desenvolvimento do trabalho.

À amiga Patricia Ebani pelo companheirismo, ensinamentos, momentos de aprendizado e acima de tudo pela amizade. Sou muito grata por você ter sido minha “mãe científica”.

À CAPES pela oportunidade de bolsa, tornando possível o sonho da obtenção do título de mestra.

À UFSM e ao PPGQ pela oportunidade de realização da graduação e pós-graduação, proporcionando-me momentos de aprendizagem e reflexão.

Aos amigos Luiz Eduardo Welter, Marta Fischer, Lia Matiazzi e Eduarda Bertoldo pelo companheirismo, palavras de conforto e pelos momentos agradáveis durante toda a realização do mestrado. Gratidão por terem segurado minha mão e não me deixado desistir.

À banca examinadora, professor Cezar Bizzi e professora Irene Garcia por terem aceitado participar desta etapa do mestrado, e pelas sugestões que complementaram o trabalho.

A todos os que participaram de alguma forma da realização deste trabalho, sem vocês essa dissertação não seria possível.

RESUMO

NANOPARTÍCULAS DE COPOLÍMERO EM BLOCO DE MALTOHEPTAOSE-B-POLIMETILMETACRILATO CONTENDO FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO PARA O USO EM TERAPIA FOTODINÂMICA

AUTORA: Luiza Bertoldo Stefanello
ORIENTADOR: Marcos Antonio Villetti

Novos nanocarreadores vem contribuindo para o desenvolvimento dos chamados fotossensibilizadores de terceira geração visando o uso na terapia fotodinâmica (PDT). A ftalocianina de cloro-alumínio (CIAIPc) é um promissor fotossensibilizador de segunda geração para o emprego na PDT, pois apresenta rendimento quântico de oxigênio singleto (Φ_{Δ}) adequado, absorção máxima no comprimento de onda janela fototerapêutica (600 - 800 nm) e baixa fotodegradação. Entretanto, a CIAIPc caracteriza-se por ser altamente hidrofóbica, resultando em uma baixa solubilidade em meios fisiológicos. Devido a este fato, a sua encapsulação em nanocarreadores é essencial para promover uma melhor biodisponibilidade do fármaco no organismo e conseqüentemente melhorar a sua atividade fototerapêutica. Sendo assim, o principal objetivo deste trabalho é encapsular a CIAIPc em nanocarreadores de copolímero em bloco MH-*b*-PMMA (MH-*b*-PMMA@CIAIPc) e avaliar a sua atividade fotodinâmica. A título de comparação, este trabalho também terá como objetivo encapsular a CIAIPc em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona e em nanoemulsões de surfactantes comerciais (Span 60[®] e Tween 80[®]). A caracterização físico-química das nanopartículas foi realizada através do raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, conteúdo de fotossensibilizador, eficiência de encapsulamento e estabilidade em condições aceleradas (LUMiSizer). A avaliação *in vitro* da atividade fotodinâmica dos sistemas nanoestruturados foi realizada através de um típico experimento de fotodegradação do supressor químico 1,3-difenilbenzofurano (DPBF). Estudou-se também o perfil de cinética de liberação da CIAIPc contida nos nanocarreadores. A toxicidade e biodistribuição das nanopartículas foi avaliada frente à espécie *Caenorhabditis elegans*. Os sistemas nanoestruturados apresentaram tamanhos nanométricos, baixos índices de polidispersão e potencial zeta negativo, com altos valores em módulo, indicando uma boa estabilidade, alta eficiência de encapsulamento, próximo a 100%. As análises de LUMiSizer confirmaram uma ótima estabilidade para as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc, sugerindo um tempo de vida de prateleira de pelo menos 3 anos. Além disso, os nanocarreadores contendo o fotossensibilizador foram capazes de gerar espécies citotóxicas de oxigênio singleto quando irradiados com luz laser (660 nm e potência de 30 mW), apresentando valores de Φ_{Δ} próximos ao da CIAIPc livre. As nanopartículas apresentaram um perfil de liberação controlado e sustentado da CIAIPc. No estudo de toxicidade, os sistemas nanoestruturados levaram a uma diminuição no comprimento do corpo dos nematódeos, entretanto, em baixas concentrações as nanopartículas não induziram o decréscimo na viabilidade celular. Além disso, as análises de biodistribuição mostraram que os nanocarreadores se localizaram majoritariamente nas células ao redor do intestino, comprovando a absorção por via oral das nanopartículas. Sendo assim, conclui-se que os nanocarreadores preparados neste trabalho são promissores para o carregamento de fotossensibilizadores hidrofóbicos para emprego na PDT.

Palavras-Chaves: Nanocarreadores. Ftalocianina de Cloro-alumínio. Copolímero Maltoheptaose-*b*-polimetilmetacrilato. Terapia fotodinâmica.

ABSTRACT

NANOPARTICLES OF MALTOHEPTAOSE-B-POLYMETHYLMETHACRYLATE BLOCK COPOLYMER CONTAINING CHLORINE-ALUMINIUM PHALOCIANINE FOR USE IN PHOTODYNAMIC THERAPY

AUTHOR: Luiza Bertoldo Stefanello

ADVISOR: Marcos Antonio Villetti

New nanocarriers have been contributing to the development of so-called third-generation photosensitizers for use in photodynamic therapy (PDT). Chloro-aluminum phthalocyanine (CIAIPc) is a promising second-generation photosensitizer for use in PDT, that exhibits adequate singlet oxygen quantum yield (Φ_{Δ}), strong absorption at the phototherapeutic window (600 - 800 nm) and low photodegradation. However, CIAIPc is characterized by highly hydrophobic, it's resulting in a poor solubility in the physiological medium. To overcome this fact, the encapsulation of CIAIPc in nanocarriers is essential to promote a better bioavailability of the drug in the organism and consequently improve the phototherapeutic activity. Thus, the objective of this work was to encapsulate CIAIPc in MH-*b*-PMMA block copolymer nanocarriers (MH-*b*-PMMA@CIAIPc) and evaluate its photodynamic activity. As a comparison, this work also had the objective to encapsulate CIAIPc in poly- ϵ -caprolactone nanocapsules and in nanoemulsions of commercial surfactants (Span 60[®] and Tween 80[®]). The physicochemical characterization of the nanoparticles was performed through hydrodynamic radius, polydispersion index, zeta potential, morphology, drug content, encapsulation efficiency and stability in accelerated conditions (LUMiSizer). In vitro evaluation of the photodynamic activity of the nanostructured systems was performed through a typical photodegradation experiment of the chemical quencher 1,3-diphenylbenzofuran (DPBF). The release kinetics profile of CIAIPc from the nanocarriers was also studied. The toxicity and biodistribution of nanoparticles were evaluated against the specie *Caenorhabditis elegans*. The nanostructured systems showed nanometer sizes, low polydispersity indices, negative zeta potential, with high values in modulus, what indicated a good stability, high encapsulation efficiency, nearly 100%. The analyses by LUMiSizer confirmed optimal stability for the MH-*b*-PMMA@CIAIPc nanoparticles, suggesting a shelf life of at least 3 years. Furthermore, the nanocarriers containing the photosensitizer were able to generate cytotoxic singlet oxygen species when irradiated with laser light (660 nm and power of 30 mW), showing Φ_{Δ} values close to those of free CIAIPc. The nanoparticles showed a controlled and sustained release profile of the drug. In the toxicity study, the nanostructured systems induced a decrease in the larval development of *C. elegans*, however, at low concentrations, the nanoparticles did not induce nematode lethality. Furthermore, the biosdistribution analyses showed that the nanocarriers were localized mostly in the cells around the intestine, confirming the oral absorption of the nanoparticles. In conclusion, the nanocarriers prepared in this work are promising for carrying hydrophobic photosensitizers for use in PDT.

Keywords: Nanocarriers. Chloro-aluminum phthalocyanine. Maltoheptaose-b-polymethylmethacrylate copolymer. Photodynamic therapy

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Profundidade de penetração das diferentes faixas de comprimento de onda em tecidos biológicos	18
FIGURA 2 – Diagrama de Jablonski ilustrando a ação da radiação na substância fotossensível e os mecanismos I e II de transferência de elétrons e energia, respectivamente	19
FIGURA 3 – Estrutura das ftalocianinas complexadas com um átomo metálico	21
FIGURA 4 – Estrutura da ftalocianina de cloro-alumínio	22
FIGURA 5 – Representação esquemática das interações de “empilhamento π ”	23
FIGURA 6 – Número de publicação entre 2010 e 2021. Utilizando as palavras-chave “nanotechnology”, “nanocarrier” e “photodynamic therapy” no banco de dados do Science Direct. (Pesquisa realizada em 31/03/2022).	24
FIGURA 7 – Esquema da fotodegradação do DPBF provocada pelo 1O_2	37
FIGURA 8 – Aspecto visual das nanopartículas: (a) MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc, (b) PCL@CIAIPc e (c) NE@CIAIPc	44
FIGURA 12 – Imagem de AFM obtida para as nanopartículas MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc.....	44
FIGURA 13 – Perfil de transmissão da luz em função do tempo, para cada posição da amostra na cubeta a 25 °C, para as nanopartículas (a) MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc, (b) PCL@CIAIPc e (c) NE@CIAIPc. A escala de tempo está representada pelas linhas vermelhas e verdes.....	47
FIGURA 14 – Aspecto visual das nanopartículas após a centrifugação por LUMiSizer.....	49
FIGURA 15 – Gráfico de índice de instabilidade em função do tempo para as nanopartículas MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc. Os valores de índice de instabilidade sinalizados no gráfico correspondem ao tempo total de experimento (12 h).....	50
FIGURA 16 – Fotodegradação do DPBF na presença da MH- <i>b</i> -PMMA@branca	52
FIGURA 17 – Fotodegradação do DPBF na presença da PCL@branca	52
FIGURA 18 – Fotodegradação do DPBF na presença da NE@branca	53
FIGURA 19 – Fotodegradação do DPBF na presença da CIAIPc livre	53

FIGURA 20 – Fotodegradação do DPBF na presença da MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação do DPBF	56
FIGURA 21 – Fotodegradação do DPBF na presença da PCL@CIAIPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação do DPBF	56
FIGURA 22 – Fotodegradação do DPBF na presença da NE@CIAIPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação do DPBF	57
FIGURA 23 – Perfil de liberação da CIAIPc encapsulada nas nanopartículas. As linhas sólidas correspondem ao modelo biexponencial	59
FIGURA 24 – Perfil de liberação (comprimento de onda versus intensidade) em solução tampão de PBS da CIAIPc a partir das nanopartículas nanopartículas (a) MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc, (b) PCL@CIAIPc e (c) NE@CIAIPc após 8 dias de experimento...	61
FIGURA 25 – Taxa de sobrevivência de vermes N2 expostos a diferentes volumes das nanopartículas durante 1h. ** ($p < 0,01$)	63
FIGURA 26 – Comprimento dos animais após 48h de exposição às Nanopartículas.....	64
FIGURA 27 – Imagens representativas do comprimento dos nematódeos após 48h de exposição às nanopartículas MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc e MH- <i>b</i> -PMMA@branca	65
FIGURA 28 – Biodistribuição das nanopartículas nos vermes N2 expostos a (a) controle (b) PCL@CIAIPc (c) MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc e (d) NE@CIAIPc	67

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Sumarização dos trabalhos apresentados no texto	29
TABELA 2 – Modelos matemáticos utilizados para analisar o perfil de liberação da CIAIPc nas nanopartículas	38
TABELA 3 – Resultados das análises físico-químicas das nanopartículas	45
TABELA 4 – Resultados dos experimentos de fotodegradação do DPBF a 25 °C	57
TABELA 5 – Constantes cinéticas de liberação de fármaco (k) e coeficiente de determinação (R^2) para os seis modelos matemáticos utilizados para avaliar o perfil de liberação	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DPBF	1,3-difenilbenzofurano
A	Absorbância
<i>k</i>	Constante Cinética
CF	Conteúdo de fotossensibilizador
EE	Eficiência de encapsulamento
DLS	Espalhamento de luz
EROs	Espécies reativas de oxigênio
S ₀	Estado singleto
S ₁	Estado singleto excitado
T ₁	Estado tripleto
FL	Fotossensibilizador Livre
CIAIPc	Ftalocianina de Cloro-Alumínio
MH- <i>b</i> -PMMA	Maltoheptaose- <i>b</i> -polimetilmetacrilato
AFM	Microscopia de força atômica
NE	Nanoemulsão
³ O ₂	Oxigênio molecular
¹ O ₂	Oxigênio singleto
Tween 80 [®]	Polisorbato 80
PCL	Poli-ε-Caprolactona
ξ	Potencial zeta
R _h	Raio Hidrofinâmico
Φ _Δ	Rendimento quântico de oxigênio singleto
Span 60 [®]	Sorbitano de monoestearato
PDT	Terapia Fotodinâmica
TCM	Triglicerídeo de cadeia média

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	16
2.1	OBJETIVO GERAL	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1	TERAPIA FOTODINÂMICA (PDT)	17
3.2	FOTOSENSIBILIZADORES	20
3.3	NANOTECNOLOGIA	23
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	REAGENTES E SOLUÇÕES	31
4.2	PREPARAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS	31
4.2.1	Formulação A: Nanopartículas de MH-<i>b</i>-PMMA (MH-<i>b</i>-PMMA@CIAIPc) ..	32
4.2.2	Formulação B: Nanopartículas de PCL (PCL@CIAIPc)	32
4.2.3	Formulação C: Nanoemulsões de Span 60® e Tween 80® (NE@CIAIPc) ...	33
4.3	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS	33
4.3.1	Determinação do Raio Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta	34
4.3.2	Análise Morfológica	34
4.3.3	Teor total de fármaco e Eficiência de Encapsulamento	35
4.3.4	Estabilidade das Nanopartículas	36
4.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA	36
4.5	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	38
4.6	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	39
4.7	VIABILIDADE CELULAR	39
4.7.1	Nematódeos: Cultura e Tratamento	39
4.7.2	Exposição	39
4.7.3	Análises do Desenvolvimento Larval	40
4.7.4	Rastreamento <i>in vivo</i> das nanopartículas nos animais	40
4.7.5	Análise Estatística	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	42
5.1	PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS	42
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA	51
5.3	CINÉTICA DE LIBERAÇÃO <i>IN VITRO</i>	58

5.4	VIABILIDADE CELULAR E BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS FRENTE AOS <i>C. elegans</i>	62
6	CONCLUSÕES	68
7	PERSPECTIVAS	70
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	71
	APÊNDICE A – ESPECTROS DE DLS E POTENCIAL ZETA PARA AS NANOPARTÍCULAS EM BRANCO	81
	APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO E TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE FÁRMACO TOTAL E FÁRMACO LIVRE	84
	APÊNDICE C – TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE FOTODEGRADAÇÃO DO DPBF	86
	APÊNDICE D – IMAGENS REPRESENTATIVAS DOS NEMATÓDEOS EXPOSTOS ÀS NANOPARTÍCULAS	94

1 INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (PDT) é um método não cirúrgico que vem sendo eficientemente empregado como alternativa no tratamento de diversas doenças neoplásicas e não neoplásicas (AGUILAR; VILCHEZ; MILLA SANABRIA, 2021; FU et al., 2019; UNANYAN et al., 2021). Comparada às terapias convencionais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, a PDT apresenta algumas vantagens como, (i) alta seletividade, causando danos apenas nas células tumorais e preservando os tecidos saudáveis ao redor da área tratada, (ii) ser minimamente invasiva, (iii) não resultar em efeitos colaterais como náuseas e vômitos e (iv) pode ser aplicada em idosos e pacientes que são vulneráveis às terapias convencionais (LO et al., 2020; OBAID et al., 2016; ZHU et al., 2018).

O princípio da PDT consiste na administração tópica, oral ou intravenosa de um fotossensibilizador e sua retenção na célula alvo, seguida por irradiação de luz ou laser com comprimento de onda específico, na presença de oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) e/ou moléculas de substrato presentes no meio. A fotoativação do fotossensibilizador gera espécies reativas de oxigênio, como por exemplo, os radicais superóxido, hidroxil e peróxil, peróxido de hidrogênio e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), os quais são nocivos aos organismos vivos pois ocasionam o estresse oxidativo, gerando danos à membrana e morte celular a partir da oxidação de biomoléculas (CHEN et al., 2017).

A ftalocianina de cloro-alumínio (CIAIPc) é um fotossensibilizador de segunda geração que tem se mostrado promissor para uso em PDT (ESCOBAR et al., 2018; NESI-REIS et al., 2018; POUND-LANA et al., 2019; SANTOS et al., 2020). Esse fotossensibilizador possui um significativo rendimento quântico de oxigênio singlete ($\Phi_{\Delta} = 0,29$ em DMSO) (IDOWU; NYOKONG, 2007), banda de absorção máxima na região da janela fototerapêutica (600 - 800 nm) e baixa toxicidade na ausência de luz (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Contudo, a utilização da CIAIPc é limitada devido a sua natureza hidrofóbica, levando a uma baixa solubilidade em meio fisiológico e a formação de agregados em solução devido às interações de “empilhamento π ”, o que diminui a capacidade de geração de $^1\text{O}_2$. Visando contornar esses problemas, a CIAIPc vem sendo encapsulada em sistemas nanoestruturados, tais como nanocápsulas, nanoesferas, micelas, micelas poliméricas, nanoemulsões e

lipossomas (CARMELLO et al., 2016; CAVALCANTE et al., 2020; ESCOBAR et al., 2018; RODRIGUES et al., 2020b; VILSINSKI et al., 2018), a qual é uma estratégia simples e viável para administração e posterior ativação deste fármaco hidrofóbico.

As nanoestruturas vêm se destacando como carreadores de fármacos hidrofóbicos devido à vasta gama de vantagens terapêuticas (CHEN et al., 2017; LI et al., 2017) frente às formas tradicionais de administração. Os nanocarreadores promovem uma liberação controlada e sustentada de fármacos, além de proporcionar o seu direcionamento na área a ser tratada (células “doentes”) apresentando assim alta seletividade, aumentam o tempo de circulação do fármaco e diminuem os efeitos colaterais devido a administração sistêmica. Além disso, os nanoveículos aumentam a estabilidade do agente ativo encapsulado frente a determinadas condições do meio, como por exemplo, pH, temperatura, fotodegradação e ação de enzimas. Além do mais, esses nanossistemas possuem maior capacidade de penetração na membrana celular e alta biodisponibilidade quando comparado ao fármaco lipofílico não encapsulado (BAER et al., 2013; GUERRINI; ALVAREZ-PUEBLA; PAZOS-PEREZ, 2018). Portanto, a nanotecnologia torna-se uma estratégia promissora no desenvolvimento de sistemas biocompatíveis de administração de fármacos hidrofóbicos.

Neste contexto, as micelas poliméricas baseadas em copolímeros em bloco têm se destacado na PDT devido a sua eficiência no carreamento, liberação e entrega do fotossensibilizador hidrofóbico nas células-alvo (ASEM et al., 2016; PY-DANIEL et al., 2016; VILSINSKI et al., 2018). Entretanto, até o momento, não existem trabalhos na literatura que investiguem o uso de gliconanopartículas para a encapsulação do fotossensibilizador hidrofóbico CIAIPc. Portanto, o estudo de nanopartículas baseadas no copolímero em bloco maltoheptaose-*b*-polimetilmetacrilato (MH-*b*-PMMA) contendo CIAIPc é necessário devido à falta de informações sobre as suas propriedades físico-químicas e sua atividade fotodinâmica, visando sua aplicação na PDT.

Levando em conta estas considerações, este estudo visou preparar e caracterizar um fotossensibilizador de terceira geração, MH-*b*-PMMA@CIAIPc, para aplicação em PDT. Como comparação, a CIAIPc também foi encapsulada em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona (PCL), e nanoemulsões (NE) de surfactantes convencionais (Span 60[®] e Tween 80[®]). Foram avaliadas as propriedades físico-

químicas das nanopartículas, incluindo o raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, eficiência do encapsulamento, conteúdo de fotossensibilizador e estabilidade sob condições aceleradas (aplicação de um campo centrífugo). Também foram avaliados, a atividade fotodinâmica das nanopartículas, através da determinação do rendimento quântico de oxigênio singleto, o perfil de liberação do medicamento, e sua distribuição e viabilidade celular frente à espécie *Caenorhabditis elegans*. Como hipótese, sugerimos que as nanopartículas de MH-*b*-PMMA@CIAIPc possuam atividade fotodinâmica adequada, apresentem liberação sustentada e controlada da CIAIPc e viabilidade celular para serem empregadas na PDT.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Encapsular o fotossensibilizador CIAIPc em nanopartículas de MH-*b*-PMMA, caracterizar e avaliar suas propriedades físico-químicas, atividade fotodinâmica, cinética de liberação e viabilidade celular, para emprego na terapia fotodinâmica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar e obter uma formulação termodinamicamente estável de nanopartículas do copolímero em bloco MH-*b*-PMMA contendo a CIAIPc. A título de comparação, o fotossensibilizador será encapsulado em nanocápsulas de poli- ϵ -caprolactona, e nanoemulsões de surfactantes convencionais (Span 60[®] e Tween 80[®]).
- Avaliar e comparar as propriedades físico-químicas dos diferentes nanocarreadores: nanocápsula, micela polimérica e nanoemulsão, através da determinação do raio hidrodinâmico (R_h), do índice de polidispersão (PDI), do potencial zeta (ξ), da morfologia, do conteúdo de fotossensibilizador (CF), da eficiência de encapsulamento (EE) e a estabilidade das nanopartículas por LUMiSizer.
- Realizar os estudos de fotodegradação do supressor químico DPBF e determinar o rendimento quântico de oxigênio singleto.
- Avaliar a cinética de liberação *in vitro* dos nanocarreadores contendo CIAIPc utilizando o método de saco de diálise.
- Avaliar a toxicidade e distribuição dos sistemas nanoestruturados através da determinação da taxa de sobrevivência, desenvolvimento larval e análise e rastreamento frente aos *Caenorhabditis elegans*.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 TERAPIA FOTODINÂMICA

Desde a antiguidade, muitos povos já utilizavam a luz para o tratamento de diversas doenças. Entretanto, a sua aplicação clínica na medicina é relativamente recente (ACKROYD et al., 2001). A primeira aplicação a nível clínico da fototerapia ocorreu em 1903, onde Niels Ryberg Finsen mostrou em seu estudo que a utilização da luz vermelha era capaz de curar lesões de varíola em pacientes contaminados (DIAS et al., 2020; FINSEN, 1903). Um ano depois, em 1904, Hermann von Tappeiner criou o termo “Ação Fotodinâmica” para descrever as reações envolvendo um fotossensibilizador e a luz, na presença de oxigênio molecular (DIAS et al., 2020).

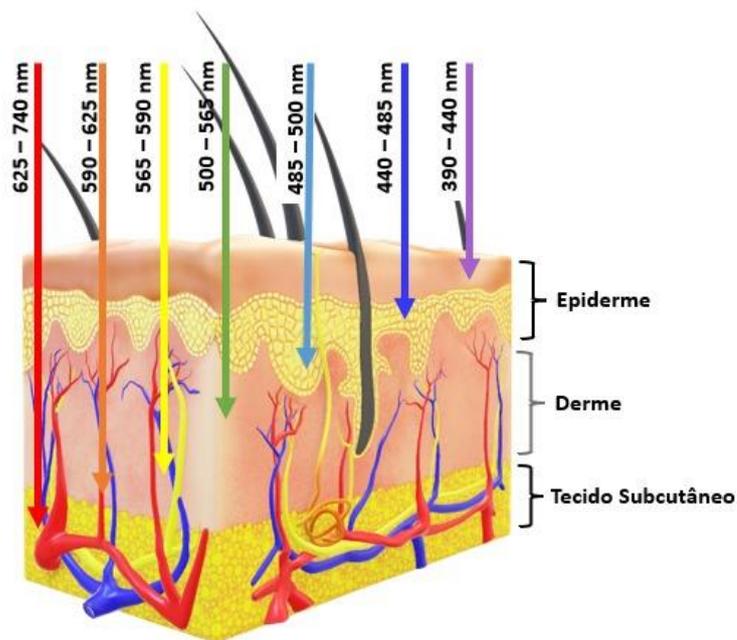
Atualmente, a PDT pode ser considerada um método alternativo no tratamento de câncer e outras patologias (BANERJEE, et al., 2020; IBARRA et al., 2021). A PDT vem sendo eficientemente empregada no tratamento de diversas doenças, como melanoma (SHAO et al., 2021; ZHONG et al., 2021), carcinoma basocelular (LIAO et al., 2021), periodontite (DALVI; HANNA; GATTANI, 2019; ZHAO et al., 2021), psoríase (JIN et al., 2015; WANG et al., 2022), acne vulgar (SONG et al., 2014; ZHANG et al., 2020), etc. Uma das vantagens ao empregar a PDT como método de tratamento, é a sua alta seletividade, pois somente as células que estiverem em contato com o fotossensibilizador e com a fonte de luz laser, de comprimento de onda adequado, sofrerão o efeito fotodinâmico (XU et al., 2017; ZHUANG et al., 2020). Outra vantagem da PDT, em relação aos tratamentos convencionais contra o câncer, como a quimioterapia e a radioterapia, é que esta apresenta diminuição considerável nos efeitos colaterais, ainda que a PDT não possa substituir os tratamentos convencionais em tecidos onde a irradiação não consiga ser penetrada na pele (DĄBROWSKI, et al., 2017).

O método empregado na PDT consiste na utilização de uma fonte de luz com comprimento de onda adequado, capaz de causar a excitação de uma substância fotossensitiva que irá interagir com o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$) ou outras moléculas do meio biológico, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs) (LEE et al., 2021; MIR

et al., 2020). Estas espécies citotóxicas são capazes de causar danos à estrutura celular, que poderá ocasionar apoptose e, posteriormente, morte celular de células alvo em condições apropriadas (CHEN et al., 2017).

Entretanto, a PDT exige que o fotossensibilizador empregado possua absorção máxima em comprimentos de onda próximos ao da janela fototerapêutica, pois é nessa região do espectro que a luz apresenta maior poder de penetração nos tecidos (Figura 1) (DĄBROWSKI, et al., 2017).

Figura 1 – Profundidade de penetração das diferentes faixas de comprimento de onda em tecidos biológicos.

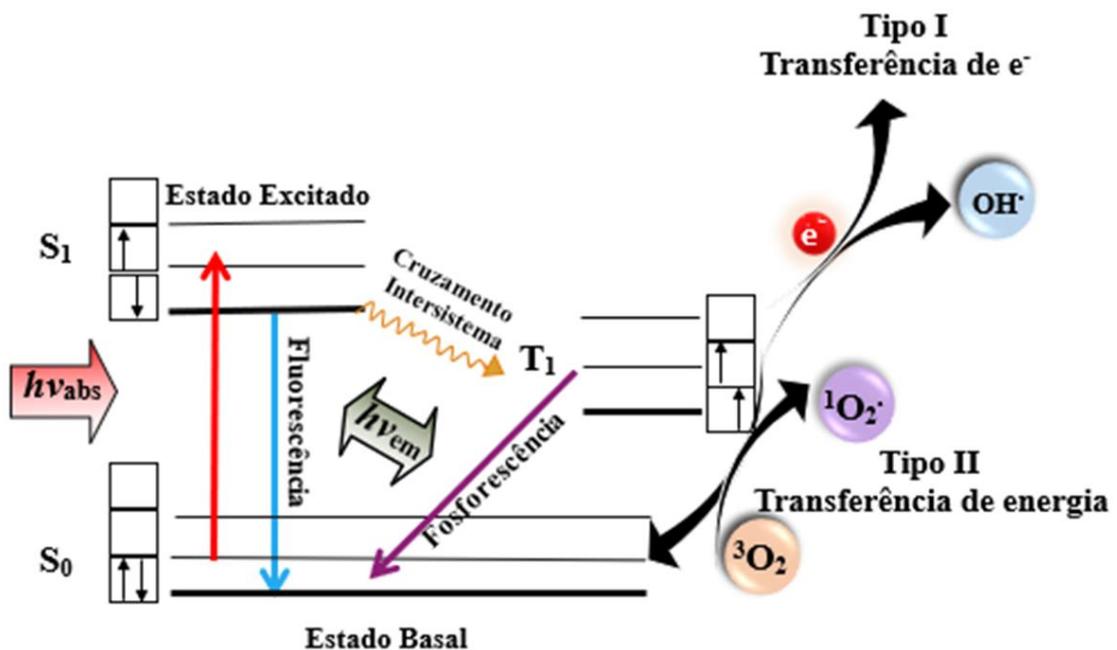


Fonte: Adaptado de DĄBROWSKI, et al., (2017).

A fotoativação do fotossensibilizador ocorre devido a molécula possuir elétrons externos com spins emparelhados, o que caracteriza o estado fundamental do fotossensibilizador (S_0). A partir da irradiação de uma fonte de luz laser em um comprimento de onda específico, estes elétrons poderão absorver esta energia e então passar a um estado excitado de mais alta energia (S_1). Este estado singleto excitado do fotossensibilizador é muito instável, e possui tempo de meia-vida na escala de nanossegundos (MFOUO-TYNGA et al., 2021). Neste estado energético, o fotossensibilizador pode liberar a energia absorvida através da emissão de

fluorescência ou através da liberação de energia na forma de calor (conversão interna). Entretanto, o fotossensibilizador também pode sofrer um cruzamento intersistema, devido ao acoplamento spin-orbita, passando do seu estado singlete excitado (S_1) para um estado tripleto excitado (T_1), invertendo o spin do elétron. O tempo de meia-vida do estado tripleto excitado é na ordem de microssegundos, esse maior tempo de meia-vida (quando comparado ao estado S_1) permite que o fotossensibilizador consiga interagir com o oxigênio molecular tripleto (3O_2) presente no meio. Neste contexto, a substância fotossensível poderá transferir: (i) elétrons, em reações do tipo I ou (ii) energia, em reações do tipo II, Figura 2 (DAI et al., 2012).

Figura 2 – Diagrama de Jablonski ilustrando a ação da radiação na substância fotossensível e os mecanismos I e II de transferência de elétrons e energia, respectivamente.



Fonte: Adaptado de MFOUO-TYNGA et al., (2021).

As reações do tipo I são caracterizadas pela transferência de elétrons da molécula de fotossensibilizador para substratos-alvo. Desta reação são formadas várias espécies reativas de oxigênio, tais como os superóxidos, peróxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxil, hidroperóxil, etc. Já as reações do tipo II são caracterizadas pela transferência de energia entre o fotossensibilizador e o 3O_2 , como produto obtêm-se o oxigênio singlete (1O_2). Ambas as espécies formadas tanto pelo

mecanismo do tipo I e II, são capazes de gerar o estresse oxidativo e morte celular, quando em contato com células doentes. Ambas as reações podem ocorrer simultaneamente, e a proporção destes processos depende tanto do ambiente em que está ocorrendo, como do fotossensibilizador utilizado, e da presença ou ausência do oxigênio molecular (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; PLAETZER et al., 2009).

3.2 FOTOSSENSIBILIZADORES

A eficácia da PDT depende essencialmente das características do fotossensibilizador, pois é ele quem vai interagir com a luz para gerar espécies reativas de oxigênio. Além de possuir banda de absorção máxima no comprimento de onda próximo ao da região da janela fototerapêutica, para que possam ser empregados na PDT, os fotossensibilizadores também precisam ser atóxicos, possuir alto rendimento quântico de oxigênio singleto, apresentar uma boa fotoestabilidade, solubilidade em meios fisiológicos, possuir baixa tendência de agregação e apresentar rápida eliminação após o tratamento (HIRAKAWA; ISHKARA, 2017; MD et al., 2017).

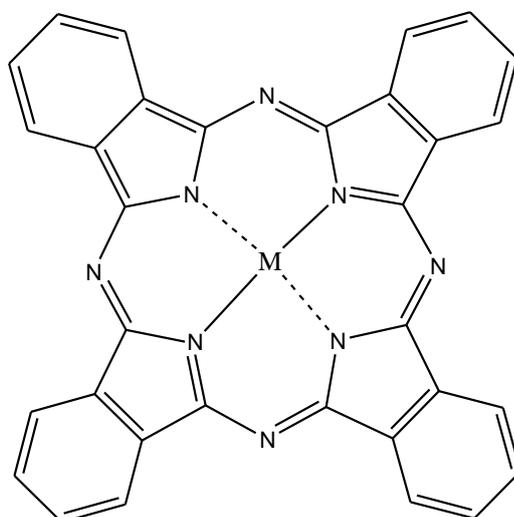
Vários compostos com propriedades fotossensibilizantes têm sido estudados, como os corantes, os fármacos e os compostos naturais (ANDERSKI et al., 2018; GHAZI et al., 2021; LIU et al., 2021). Dentre as substâncias ativas na PDT encontram-se os fotossensibilizadores de primeira geração, onde estão incluídos os derivados da hematoporfirina, que são constituídos de misturas porfirínicas, a qual é formada por estruturas contendo grupos cromóforos tetrapirrólicos. Essas moléculas apresentam um sistema eletrônico altamente conjugado, o que confere a estes compostos possibilidades de transições eletrônicas na faixa do espectro visível ao ultravioleta. Entretanto, esta classe de fotossensibilizadores apresenta algumas limitações para o emprego na PDT, como baixa pureza, baixa seletividade e baixa absorção no comprimento de onda da janela fototerapêutica (ZHANG, et al., 2018; GOMES, et al., 2018).

Visando minimizar estas limitações, surgiram os fotossensibilizadores de segunda geração, onde estão presentes compostos puros como as clorinas

(MUDDINETI et al., 2020), bacterioclorinas (MOROZOVA et al., 2021; PRATAVIEIRA et al., 2021), naftalocianinas (LUAN et al., 2013) e as ftalocianinas (DE SOUZA et al., 2016; EBANI et al., 2021). Em comparação aos fotossensibilizadores de primeira geração, os de segunda geração possuem algumas vantagens para o uso em PDT, como por exemplo, maior absorção no comprimento de onda da janela fototerapêutica, menor toxicidade, além de serem mais rapidamente eliminados do organismo e possuírem alta pureza (BROEKGAARDEN et al., 2017). Em nosso trabalho escolhemos utilizar a ftalocianina de cloro-alumínio devido ao fato deste composto apresentar um rendimento quântico de geração de oxigênio singleto adequado e não sofrer degradação quando submetido à luz laser.

As ftalocianinas são uma classe de corantes compostos por quatro unidades isoindólicas conectadas entre si por átomos de nitrogênio, formando um sistema aromático planar, que pode complexar um metal central, Figura 3 (RAK, et al., 2019).

Figura 3 – Estrutura das ftalocianinas complexadas com um átomo metálico.



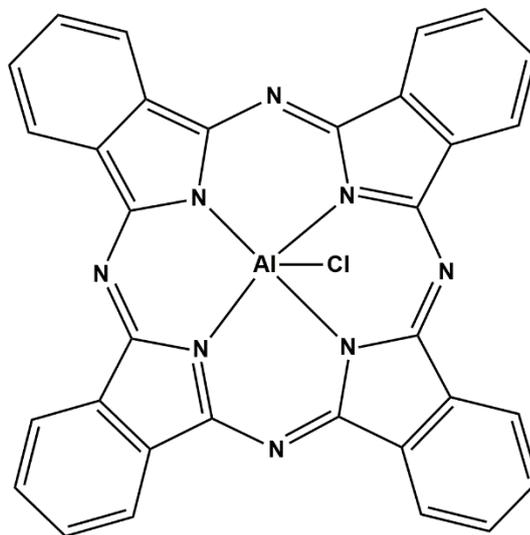
Fonte: Próprio autor.

Essa classe de fotossensibilizadores exibe comprimentos de onda de absorção e fluorescência na faixa de 650 a 800 nm e também apresenta alta habilidade de produzir oxigênio singleto, além do mais, as características de cada ftalocianina depende do átomo metálico central na sua estrutura, tais como zinco (ZnPc),

magnésio (MgPc), alumínio (CIAIPc), cobalto (CoPc), etc (LO et al., 2020; SANTOS et al., 2020).

A CIAIPc é um fotossensibilizador hidrofóbico derivado da família das ftalocianinas, a sua estrutura consiste em um macrociclo tetrapirrólico com um íon metálico (Al^{3+}) complexado (Figura 4). A incorporação de um metal diamagnético em um macrociclo aumenta as propriedades fotofísicas e fotoquímicas da molécula (SANTOS, et al., 2020). O uso da CIAIPc como fotossensibilizador vem sendo estudado na literatura para aplicação na PDT contra várias patologias causadas por *Leishmania braziliensis* (ESCOBAR et al., 2018), *Staphylococcus aureus* (RIBEIRO, et al., 2015) e *Candida albicans* (CARMELLO, et al., 2016). A CIAIPc pode ser considerada um fotossensibilizador promissor, pois além de apresentar espectro de absorção da janela fototerapêutica, o composto também apresenta um bom rendimento quântico de 1O_2 , uma baixa taxa de fotodegração e baixa toxicidade na ausência de luz (SIQUEIRA-MOURA, et al., 2013).

Figura 4 – Estrutura da ftalocianina de cloro-alumínio.

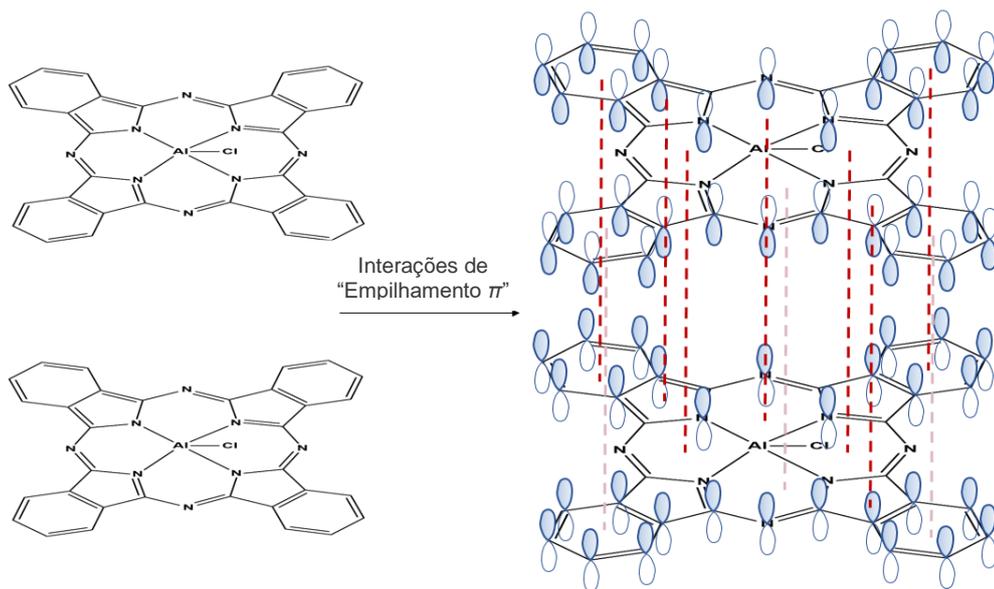


Fonte: Próprio autor.

A baixa solubilidade da CIAIPc em meio fisiológico torna a sua aplicação na PDT um grande desafio. A hidrofobicidade ocorre devido a presença dos anéis porfirínicos altamente hidrofóbicos, que tendem a sofrer agregação por associação

coplanar (interações de “empilhamento π ” – Figura 5), passando de monômeros a dímeros e até à estruturas maiores (GOBO, 2013). Essa característica torna mais difícil a utilização da CIAIPc livre na PDT (LO et al., 2020; OBAID et al., 2016) e, como alternativa para solucionar esta limitação, surge a chamada terceira geração de fotossensibilizadores, a qual é formado por um fotossensibilizador de segunda geração conjugado ou encapsulado em nanopartículas biodegradáveis/biocompatíveis. Na terceira geração, o fotossensibilizador pode estar conjugado a um composto-alvo, como por exemplo, anticorpos, aminoácidos e peptídeos, ou encapsulado em nanoestruturas como lipossomas, micelas poliméricas, nanocápsulas, nanoesferas e nanoemulsões (JIN; ZHENG, 2011; MFOUO-TYNGA et al., 2021; SETARO et al., 2020; TEMIZEL et al., 2014).

Figura 5 – Representação esquemática das interações de “empilhamento π ”.



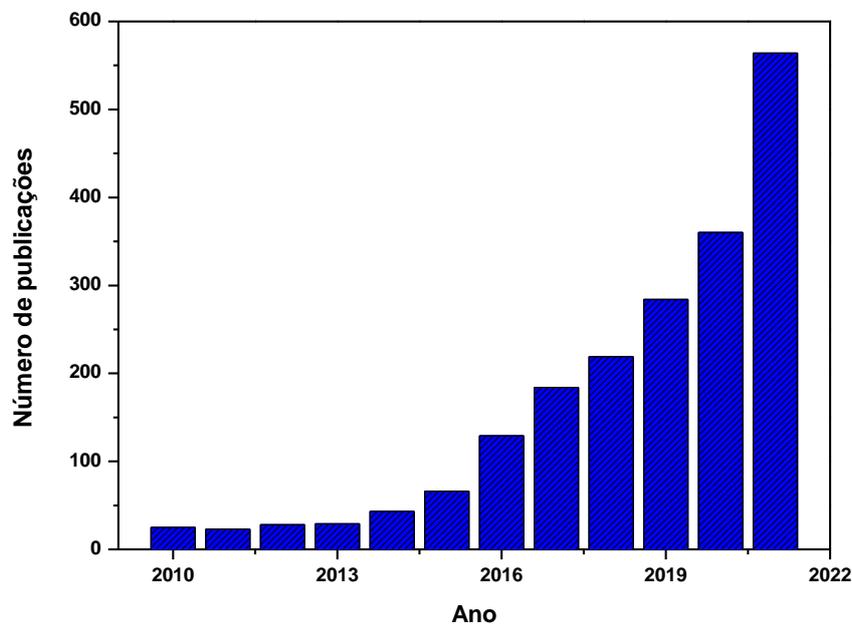
Fonte: Adaptado de GOBO, (2013).

3.3 NANOTECNOLOGIA

O campo da nanotecnologia é focado no estudo de sistemas em escala nanométrica (ZHAO, et al., 2017; SANTOS, et al., 2019) e na sua aplicação em diversas áreas, como na produção de fármacos, em tecnologias de informação e

comunicação, e na produção de materiais mais resistentes e leves (BANSAL et al., 2020; EKENGWU; UTU, 2019; JI; KOHANE, 2019; OMANOVIC et al., 2019; SINGH et al., 2019; ZHANG et al., 2016). Utilizando os termos “*nanotechnology*”, “*nanocarrier*” e “*photodynamic therapy*” no banco de dados do *Science Direct*, podemos verificar na Figura 6 um crescente aumento no número de artigos publicados nos últimos anos, evidenciando os avanços nesta área.

Figura 6 – Número de publicação entre 2010 e 2021. Utilizando as palavras-chave “*nanotechnology*”, “*nanocarrier*” e “*photodynamic therapy*” no banco de dados do *Science Direct*. (Pesquisa realizada em 31/03/2022).



O desenvolvimento na área de nanoveículos tem despertado grande interesse devido as suas várias aplicações terapêuticas (CARMELLO et al., 2016; RODRIGUES et al., 2020b). Os nanocarreadores se apresentam mais eficientes do que o fármaco livre na administração oral ou injetável, devido as características hidrofóbicas destes (OBAID, et al., 2016). Além disso o encapsulamento de substâncias ativas em sistemas nanoestruturados torna o tratamento mais eficaz, pois alia a capacidade de transpassar barreiras biológicas (membranas lipoproteicas) com o direcionamento da substância ativa a locais específicos (sítios-alvo). Por este motivo, as propriedades físico-químicas das nanoestruturas são essenciais nos sistemas de entrega de medicamentos e podem ser ajustadas para atingir a eficácia terapêutica desejada. Por

exemplo, o tamanho e as propriedades de superfície dos sistemas nanoestruturados são de extrema importância para que estes possam atravessar a camada de muco intestinal (GUO et al., 2021; LIU; LENG; LIU, 2021) e serem melhores absorvidos pelas células epiteliais intestinais (enterócitos e células M) quando administrado oralmente (DES RIEUX et al., 2006; ROGER et al., 2010). Segundo Roger e colaboradores (2010), uma diminuição do tamanho das nanopartículas de PLGA aumentou o transporte transcelular por transcitose, e as nanopartículas com 100 nm mostraram uma eficiência de absorção de 15 a 250 vezes maior no tecido intestinal quando comparadas com partículas maiores (500 nm, 1 μ m e 10 μ m). Da mesma maneira, investigações *in vitro* demonstraram uma maior eficiência de absorção celular por células de Caco-2 para nanopartículas de poliestireno de 100 nm em comparação com os outros tamanhos (200 e 500 nm) (DESAI et al., 1996). Além disso, nanopartículas que apresentam tamanhos menores, entre 50 e 300 nm são mais adequadas para o acúmulo no alvo tumoral em relação às células normais devido ao fenômeno de efeito de maior permeabilidade e retenção (efeito EPR) (DAI et al., 2017; KULKARNI; FENG, 2013).

Outras vantagens dos sistemas nanoestruturados incluem: (i) a liberação sustentada de fármaco, (ii) utilização de menor dosagem do fármaco, diminuindo assim os efeitos colaterais, (iii) rápida eliminação do organismo e (iv) aumento da estabilidade da substância ativa frente a determinadas condições de degradação do meio, como pH, calor e/ou fotodegradação, etc (BAER et al., 2013; GUERRINI; ALVAREZ-PUEBLA; PAZOS-PEREZ, 2018).

Até o presente momento poucos trabalhos na literatura destacam o uso da CIAIPc em nanoveículos para fins terapêuticos. Cavalcante e colaboradores (2020) encapsularam a CIAIPc em nanopartículas de quitosana e verificaram sua ação antimicrobiana contra a bactéria *Streptococcus mutans*. As nanopartículas preparadas apresentaram tamanhos em escala nanométrica, e redução significativa na viabilidade celular das bactérias, mostrando-se superior ao fotossensibilizador livre (não encapsulado). Em outro estudo, Rodrigues e colaboradores (2020b) analisaram a ação de nanoemulsões contendo CIAIPc frente a adenocarcinoma mamário murino. Os autores constataram a rápida internalização das NE@CIAIPc, e sua retenção majoritária nas mitocôndrias, lisossomos e retículo endoplasmático. Os autores

concluíram que as nanoemulsões foram eficientes na erradicação de tumores primários em mamas de ratos.

Asem e colaboradores (2016) encapsularam a CIAIPc em nanopartículas de copolímero em bloco de poli(etileno glicol)-*b*-poli- ϵ -caprolactona (PEG-*b*-PCL). Foram obtidos nanocarreadores com tamanhos entre 66 e 99 nm, e eficiência de encapsulamento entre 66 e 78%. Os autores monitoraram a biodistribuição do fármaco em ratos, e constataram que as nanopartículas PEG-*b*-PCL@CIAIPc apresentaram melhor biodistribuição e absorção pelos órgãos, como pulmão, fígado e baço, quando comparada ao fotossensibilizador livre. Vilsinski e colaboradores (2018) encapsularam a CIAIPc em micelas poliméricas de copolímero em bloco de poliestireno-*b*-poli(ácido acrílico) (PS-*b*-PAA). Os autores obtiveram micelas poliméricas com tamanho de 200 nm, baixo índice de polidispersão (0,121), eficiência de encapsulamento maior que 95% e rendimento quântico de oxigênio singlete igual à 0,3. Foram realizados ensaios de fototoxicidade frente a células de Caco-2, e constatados danos celulares após 30 min de irradiação de luz LED (663 nm e dose de 1,62 μJcm^{-2}). Além disso, foi observado que as micelas poliméricas PS-*b*-PAA@CIAIPc não apresentaram citotoxicidade na ausência de luz.

Na literatura também destacam-se estudos de encapsulação da CIAIPc aliada à terapia fotodinâmica (PDT) frente a protozoários do gênero *Leishmania*. Escobar e colaboradores (2018) encapsularam este fármaco em lipossomas de fosfatidilcolina de soja, e testaram sua ação contra *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Os autores obtiveram partículas com tamanho de 118 nm, e potencial zeta de -37 mV. Foi constatado que apesar das nanopartículas preservarem a fotoatividade da CIAIPc elas não foram eficazes contra *L. braziliensis* em modelos *in vivo*. Por outro lado, frente a *Leishmania amazonensis*, Lopes e colaboradores (2019) obtiveram melhores resultados encapsulando a CIAIPc em lipossomas de fosfatidilcolina do ovo. A fotoatividade das nanopartículas foi avaliada em modelos *in vivo* para o tratamento de leishmaniose cutânea. Os nanocarreadores apresentaram tamanhos entre 240 e 309 nm, baixos índices de polidispersão (de 0,126 a 0,143) e eficiência de encapsulamento entre 67 e 76%. Analisando a redução da carga parasitária na lesão cutânea e no baço dos animais infectados, os autores constataram que as nanoestruturas contendo CIAIPc apresentaram-se tão eficazes quanto os lipossomas contendo antimônio pentavalente (fármaco usualmente utilizado no tratamento de leishmaniose cutânea,

porém possui uma significativa toxicidade). Os autores propõem que a utilização das nanopartículas de lipossoma@CIAIPc pode ser uma alternativa para o tratamento da leishmaniose cutânea.

Além de ser um fotossensibilizador utilizado contra agentes patógenos, a CIAIPc vem sendo utilizada contra células cancerígenas. Goto e colaboradores (2017) encapsularam este fármaco em nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) de Behenato de gliceril, e avaliaram sua atividade fotodinâmica *in vitro* frente à células de melanoma (B16-F10). As nanopartículas SLN@CIAIPc apresentaram tamanho em escala nanométrica (de 100 a 200 nm), baixos índices de polidispersão (menor que 0,3), e alta eficiência de encapsulamento (próximo a 100%). Os autores destacaram que as SLN@CIAIPc apresentaram efeitos fototóxicos significativos frente às células cancerígenas e superior ao fármaco livre.

Em outro estudo, Py-Daniel e colaboradores (2016) encapsularam a CIAIPc em micelas poliméricas de PEO-*b*-PPO-*b*-PEO (Pluronic F127[®]), e realizaram ensaios *in vitro* de fototoxicidade frente a células de carcinoma pulmonar humano (A549). Foram obtidas micelas poliméricas com tamanho aproximado de 6 nm e eficiência de encapsulamento de 90%. Após o período de incubação das células com as nanopartículas PEO-*b*-PPO-*b*-PEO@CIAIPc e irradiação de luz LED (660 nm e dose de 25,3 Jcm⁻²), foi constatado um decaimento de 90% na viabilidade celular. Os autores mostraram que não houve citotoxicidade nas células que não receberam a irradiação de luz.

Cabral e colaboradores (2021) prepararam nanoemulsões do copolímero tribloco poli(etileno-glicol)-*b*-poli(propileno-glicol)-*b*-poli(etileno-glicol) (Poloxamer 188), contendo CIAIPc juntamente com o quimioterápico Doxorubicina (DX). A atividade fotodinâmica das nanopartículas PEG-*b*-PPG-*b*-PEG@CIAIPc/DX foi avaliada frente a modelos *in vivo* de câncer de mama. Os autores relataram que após a administração das nanoemulsões foram observadas: (i) regressão tumoral por apoptose e necrose extensa, (ii) diminuição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular, e (iii) aumento na expressão dos genes envolvidos na apoptose. As nanoemulsões PEG-*b*-PPG-*b*-PEG@CIAIPc/DX apresentaram um prognóstico melhor do que o convencional (apenas a nanoemulsão com o quimioterápico). Dessa forma, os autores concluem que a PDT associada à quimioterapia proporciona uma

boa resposta antitumoral e se apresenta como uma alternativa promissora de terapia antitumoral direcionada.

Castilho-Fernandes e colaboradores (2017) encapsularam a CIAIPc em nanoemulsões de lecitina de soja (epikuron 170[®]), Span 60[®], e PEG-*b*-PPG-*b*-PEG (poloxamer 188), e avaliaram sua fotoatividade frente a células de glioblastoma. Os autores observaram que as NE@CIAIPc combinadas com a irradiação de luz (660 nm e dose de 240 mJ cm⁻²), suprimiram efetivamente o crescimento das células de glioblastoma e induziram com sucesso a apoptose e/ou necrose das células cancerígenas. Rodrigues e colaboradores (2020a) estudaram a fotoatividade das nanoemulsões citadas anteriormente frente ao *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Como resultados, os autores relatam que a associação das NE@CIAIPc com a irradiação de luz (675 nm e dose de 100 J cm⁻²) reduziu em 5 ordens de magnitude a viabilidade celular para ambos os fungos. A internalização da NE@CIAIPc pelos fungos mostrou que o fotossensibilizador não penetra no núcleo das células, mas se acumula em regiões específicas do citoplasma.

Tedesco e colaboradores (2021) prepararam nanoemulsões de colesterol contendo a CIAIPc. As NE@CIAIPc apresentaram tamanho de 127 nm, potencial zeta negativo com valor igual a -29 mV, eficiência de encapsulamento de 81% e estabilidade de 17 meses de armazenamento. Os ensaios de atividade fotodinâmica das NE@CIAIPc foram realizados frente a células de glioblastoma (U-87 MG). As nanoemulsões apresentaram atividade fotodinâmica superior à CIAIPc livre, e não apresentaram citotoxicidade na ausência de luz.

Morgado e colaboradores (2017) desenvolveram nanoemulsões de óleo de rícino polioxil-35 (Cremophor ELP[®]) contendo CIAIPc, e desenvolveram um ensaio clínico frente a casos de onicomicose. Os autores destacam que as NE@CIAIPc associadas à PDT apresentaram uma eficácia antifúngica semelhante aos tratamentos convencionais. Além disso, as nanopartículas apresentaram algumas vantagens em relação ao tratamento convencional, como a ausência de efeitos colaterais e a possibilidade de repetir o procedimento sem induzir resistência fúngica. Para melhor entendimento, todos os trabalhos citados estão sumarizados na Tabela 1.

Tendo em vista estas considerações, novas investigações nesta área são necessárias para avaliar os fotossensibilizadores de terceira geração visando impulsionar a terapia fotodinâmica. Assim, os objetivos apresentados para a realização deste trabalho se justificam pela falta de estudos envolvendo copolímeros em bloco à base de oligossacarídeos para o encapsulamento de fotossensibilizadores hidrofóbicos. Neste sentido, o estudo envolvendo a encapsulação da CIAIPc no copolímero em bloco MH-*b*-PMMA torna-se de fundamental importância para a nanomedicina com emprego na PDT.

Tabela 1 – Sumarização dos trabalhos apresentados no texto.

Autores/A no	Nanopartículas	Atividade fotodinâmica frente à	Caracterizações das Nanopartículas	Resultados obtidos
Asem et al. (2016)	Micelas poliméricas de PEG- <i>b</i> -PCL	Modelos <i>in vivo</i> de ratos	Tamanho entre 66 e 99 nm e EE% entre 66 e 78 %.	Verificaram a biodistribuição da CIAIPc em ratos. Constataram uma melhor absorção das nanopartículas no pulmão, fígado e baço do que o fármaco livre.
Py-Daniel et al. (2016)	Micelas poliméricas de Pluronic 127	Células de carcinoma pulmonar humano	Tamanho aprox. de 6 nm e EE% de 90%.	Os autores constataram um decaimento de 90% na viabilidade celular e que não houve citotoxicidade nas células que não receberam a irradiação de luz.
Castilho-Fernandes et al. (2017)	NE de Lecitina de soja, Span 60® e PEG- <i>b</i> -PPG- <i>b</i> -PEG	Células de Glioblastoma	-	Constataram que as NE suprimiram efetivamente o crescimento celular de glioblastoma e induziram a apoptose celular.
Goto et al. (2017)	Nanopartículas de Behenato de gliceril	Células de melanoma	Tamanhos entre 100 e 200 nm, PDI menor que 0,3, e EE% próximo a 100%.	As SLN@CIAIPc apresentaram efeitos fototóxicos significativos frente às células cancerígenas e superior ao fármaco livre
Morgado et al. (2017)	NE de Cremophor ELP®	Estudo clínico frente à Onicomiose	-	As NE apresentaram-se tão eficientes contra a doença como os medicamentos usados no tratamento convencional. E apresentaram a vantagem de não induzir resistência fúngica.
Escobar et al. (2018)	Lipossomas de fosfatidilcolina de soja	<i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	Tamanho aprox. de 118 nm e potencial zeta de -37 mV.	Constataram a atividade fotodinâmica dos lipossomas. Entretanto, estes não foram eficazes contra o <i>L. braziliensis</i> em modelos <i>in vivo</i> .

Vilsinski et al. (2018)	Micelas poliméricas de PS- <i>b</i> -PAA	Células de Caco-2	Tamanho aprox. de 200 nm, PDI aprox. de 0,121, e EE% maior que 95%.	Foram constatados danos celulares após 30 min de irradiação de luz LED. As PS- <i>b</i> -PAA@CIAIPc não apresentaram citotoxicidade na ausência de luz.
Lopes et al. (2019)	Lipossomas de fosfatidilcolina de ovo	Modelos <i>in vivo</i> de Leishmaniose cutânea (<i>Leishmania amazonenses</i>)	Tamanhos entre 240 e 309 nm, PDI menor que 0,150, e EE% entre 67 e 76%.	Os Lipossomas@CIAIPc apresentaram-se tão eficazes quanto os lipossomas contendo antimônio pentavalente (tratamento convencional) na redução da carga parasitária na lesão cutânea e no baço dos animais infectados.
Cavalcante et al. (2020)	Nanopartículas de Quitosana	<i>Streptococcus mutans</i>	-	Os autores constataram que as nanopartículas apresentaram uma redução significativa na viabilidade celular, sendo superior ao fármaco livre.
Rodrigues et al. (2020b)	NE de óleo de rícino polioxil-35 (Kolliphor®)	Adenocarcinoma mamário murino	Tamanho aprox. de 25 nm e PDI aprox. de 0,058.	Foi constatada uma rápida internalização das NE@CIAIPc, e sua retenção no citoplasma. As NE@CIAIPc foram eficientes na erradicação de tumores primários em mamas de ratos.
Rodrigues et al. (2020a)	NE de Lecitina de soja, Span 60® e PEG- <i>b</i> -PPG- <i>b</i> -PEG	<i>Candida albicans tropicalis</i>	-	As NE apresentaram uma redução de 5 ordens de magnitude na viabilidade celular contra os fungos. Os autores também constataram que as NE se acumularam no citoplasma das células e não no núcleo.
Cabral et al. (2021)	Copolímero tribloco PEG- <i>b</i> -PPG- <i>b</i> -PEG contendo CIAIPc e Dexorubicina (quimioterápico)	Modelos <i>in vivo</i> de câncer de mama	-	(i) Regressão tumoral por apoptose e necrose extensa; (ii) diminuição da expressão do fator de crescimento endotelial vascular; (iii) aumento na expressão dos genes envolvidos na apoptose. As NP apresentaram um prognóstico melhor do que o convencional (apenas com o quimioterápico).
Tedesco et al. (2021)	NE de colesterol	Células de glioblastoma	Tamanho aprox. de 127 nm, potencial zeta de -29 mV, EE% de 81 % e estabilidade de até 17 meses.	As NE apresentaram uma atividade fotodinâmica superior que a do fármaco livre. E não apresentaram citotoxicidade na ausência de luz.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os reagentes ftalocianina de cloro-alumínio (CIAIPc) (85%), poli- ϵ -caprolactona (PCL, $M_w = 70$ kD à 90 kD), monoestearato de sorbitano (Span 60[®]), polisorbato 80 (Tween 80[®]), 1,3-difenilisobezofurano (DPBF) (97%) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil). Os triglicerídeos dos ácidos cáprico e caprílico (TCM) foram fornecidos pela Delaware (Porto Alegre, Brasil). O copolímero em bloco Maltoheptaose-*b*-Polimetilmetacrilato (MH_{1,2k}-*b*-PMMA_{4,1k}) foi gentilmente cedido pelo grupo de pesquisa do CERMAV (Université Grenoble Alpes, Grenoble, França) e o óleo Labrathec Lipophile WL 1349 (triglicerídeo de cadeia média) foi fornecido pela Gattefossé SAS (Saint-Priest, France). Os solventes etanol, acetona e dimetilformamida (DMF) foram adquiridos da Dinâmica (São Paulo, Brasil) e o dimetilsulfóxido (DMSO) foi adquirido da Neon (São Paulo, Brasil). Todos os solventes utilizados foram de grau analítico e todas as soluções foram preparadas com água ultrapura (condutividade menor do que $0.05 \mu\text{Scm}^{-1}$) (Milli-Q) coletada de uma aparelho Millipore.

4.2 PREPARAÇÃO DAS NANOESTRUTURAS

Foram preparados três distintos nanocarreadores baseados no copolímero em bloco MH-*b*-PMMA, no polímero PCL e nos surfactantes convencionais Span 60[®] e Tween 80[®]. As micelas poliméricas de MH-*b*-PMMA foram preparadas pelo método de nanoprecipitação padrão, previamente descrito na literatura (OTSUKA et al., 2013a; VILLETTI et al., 2021), com algumas modificações. As nanopartículas de PCL foram preparadas a partir do método de deposição interfacial do polímero pré-formado, como descrito por Fessi e colaboradores (1989). As nanoemulsões foram preparadas similarmente, porém sem a adição do polímero na fase orgânica. A seguir descreve-se a preparação das três formulações, feitas em triplicata ($n=3$).

4.2.1 Formulação A: Nanopartículas de MH-*b*-PMMA (MH-*b*-PMMA@CIAIPc)

No processo de produção deste sistema, vários parâmetros foram testados, como a concentração do copolímero em bloco, a proporção da mistura dos solventes acetona/água, a quantidade do óleo Labrathec, a velocidade de rotação e a temperatura de rotoevaporação. Por fim, escolheu-se a formulação que apresentou-se termodinamicamente mais estável.

Primeiramente, em um frasco foram dissolvidos 3 mg do MH-*b*-PMMA em 4 g da mistura de solventes acetona/água (4:1 m/m), deixou-se a solução sob agitação magnética durante 3 h à 40 °C. Após, deixou-se a solução decantar *overnight*. Em um outro frasco pesou-se 1,7 mg do óleo Labrathec, 0,2 g da solução de CIAIPc (150 μmolL^{-1}) e 1,8 g da solução de copolímero preparada anteriormente. Deixou-se a mistura em agitação moderada por 30 min. Após, em um erlenmeyer contendo 40 g de água ultra pura filtrada (filtro hidrofílico 0,45 μm - Millipore) adicionou-se a fase orgânica, gota a gota sob agitação magnética, deixou-se a suspensão em agitação por 2 h. Posteriormente, a suspensão foi evaporada sob pressão reduzida à 35 °C até a massa final de 4 g. As nanopartículas apresentaram um aspecto transparente de coloração azulada. Da mesma forma foram preparadas as nanopartículas em branco, porém não adicionou-se o fotossensibilizador.

4.2.2 Formulação B: Nanopartículas de PCL (PCL@CIAIPc)

Em um bequér de 50 mL foram adicionados 0,1 g de poli- ϵ -caprolactona, 0,0766 g de Span 60[®], 0,33 mL de TCM, 0,5 mL da solução de CIAIPc (150 μmolL^{-1} em Etanol) e 27 mL de acetona. A solução foi mantida sob agitação magnética durante uma hora, à temperatura de 40 °C. Em um outro erlenmeyer adicionaram-se 0,0766 g de Tween 80[®] e 54 mL de água ultra pura filtrada (filtro hidrofílico de 0,45 μm - Millipore), deixou-se a solução sob agitação em temperatura ambiente para a total solubilização do surfactante. Posteriormente, com o auxílio de um funil, a fase orgânica foi vertida lentamente sobre a fase aquosa, sob agitação magnética em temperatura ambiente. A suspensão permaneceu em agitação durante 15 minutos, e então foi evaporada sob

pressão reduzida a 40 °C, para a total evaporação do solvente orgânico (acetona e etanol), até a massa final de 10 g. Os nanocarreadores apresentaram um aspecto opalescente com uma leve coloração azulada. As nanopartículas brancas foram preparadas da mesma maneira, porém sem a adição do fotossensibilizador.

4.2.3 Formulação C: Nanoemulsões de Span 60[®] e Tween 80[®] (NE@CIAIPc)

Em um bequer de 50 mL foram adicionados 0,0766 g de Span 60[®], 0,33 mL de TCM, 0,5 mL da solução de CIAIPc (150 μmolL^{-1} em Etanol) e 27 mL de acetona. A solução foi mantida sob agitação magnética durante 1 h, à temperatura de 40 °C. Em um outro erlenmeyer adicionaram-se 0,0766 g de Tween 80[®] e 54 mL de água ultra pura filtrada (filtro hidrofílico de 0,45 μm - Millipore), deixou-se a solução sob agitação em temperatura ambiente para a total solubilização do surfactante. Posteriormente, com o auxílio de um funil, a fase orgânica foi vertida lentamente sobre a fase aquosa, sob agitação magnética em temperatura ambiente. A suspensão permaneceu em agitação durante 15 minutos, e então foi evaporada sob pressão reduzida a 40 °C, para a total evaporação do solvente orgânico (acetona e etanol), até a massa final de 10 g. As nanopartículas apresentaram um aspecto opalescente com uma leve coloração azulada. Da mesma forma, as nanoemulsões brancas foram preparadas sem o fotossensibilizador.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOPARTÍCULAS

As nanopartículas foram caracterizadas através do raio hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, morfologia, conteúdo de fotossensibilizador, eficiência de encapsulamento e estabilidade em condições aceleradas (LUMiSizer).

4.3.1 Determinação do Raio Hidrodinâmico, Índice de Polidispersão e Potencial Zeta

As análises de raio hidrodinâmico (R_h), índice de polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (ξ) foram realizadas no equipamento Nanozetasizer ZS (Nano ZS Zetasizer Nanoseries, Malvern Instruments, Worcestershire, UK), o qual opera com uma fonte de laser de He-Ne ($\lambda = 663$ nm e $P = 5$ mW). As análises de R_h e PDI foram realizadas a 25 °C com ângulo de espalhamento de luz fixo de 173°. As análises de ξ foram realizadas medindo-se a mobilidade eletroforética das dispersões coloidais. Todas as análises foram realizadas em triplicatas ($n = 3$), as nanoestruturas PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc foram diluídas 250 vezes em água ultrapura filtrada (0,45 μm – filtro hidrofílico da Millipore) devido a sua alta opalescência. Já as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc foram analisadas diretamente, sem o fator de diluição, já que não apresentam o fenômeno de retroespalhamento que poderia interferir na análise de DLS.

4.3.2 Análise Morfológica

A análise morfológica das nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc foi realizada por meio da técnica de Microscopia de Força Atômica (AFM) utilizando um microscópio Park NX10 (Park Systems, Suwon - Korea) equipado com o software Smart Scan versão 1.0.RTM11a. As amostras foram preparadas através da deposição de 10 μL do nanocarreador (diluído 250 vezes em água ultrapura Milli-Q) em uma placa de mica clivada. Após, realizou-se a evaporação do solvente sob condições ambientais. As imagens de AFM foram registradas em modo contato (*tapping*) em uma superfície de 2 μm^2 e a 0,7 Hz. As imagens foram processadas usando o software XEI versão 4.3.4 Build 22. RTM1.

4.3.3 Conteúdo de Fotossensibilizador e Eficiência de Encapsulamento

As análises de conteúdo de fotossensibilizador foram realizadas em triplicata ($n = 3$) após a dissolução das nanopartículas em DMF (375 μL das dispersões coloidais completados com DMF até o volume final de 5 mL). As suspensões foram mantidas sob agitação magnética durante 15 min à temperatura ambiente, após este tempo, as amostras foram diluídas em DMF na proporção de 1:3 v/v. Utilizou-se a técnica de fluorescência para a determinação do teor total de CIAIPc nas nanopartículas, esse método foi validado por Siqueira-Moura e colaboradores (2010) para a determinação de ftalocianinas. Para as análises foram utilizados 615 nm como comprimento de onda de excitação e o pico de emissão foi em 675 nm. Os espectros de fluorescência se encontram no Apêndice B. A curva de calibração da CIAIPc em DMF foi realizada no intervalo de concentração entre $1,6 \times 10^{-3}$ e $7,2 \times 10^{-2} \mu\text{molL}^{-1}$, e apresentou um coeficiente de determinação próximo a 1 ($R^2 = 0,9998$) (Apêndice B).

O teor de fármaco não encapsulado foi determinado pela coleta do ultrafiltrado após a separação das nanopartículas por ultrafiltração/centrifugação (Amicon® Ultra 0,5 mL, MW 10000, Millipore, Carrigtwohill, Irlanda) em 3000 g (5600 rpm), durante 10 min. O ultrafiltrado foi mantido na estufa sob vácuo à temperatura de 40 °C até a evaporação total do solvente (água), e então foi dissolvido em DMF. O conteúdo de CIAIPc não encapsulada também foi determinado pelo método de fluorescência. A porcentagem da eficiência de encapsulamento (EE%) foi calculada a partir da Equação 1.

$$EE\% = \frac{TT-TL}{TT} \times 100 \quad (1)$$

Onde TT e TL correspondem ao Teor Total de CIAIPc (conteúdo de fotossensibilizador) e ao Teor de CIAIPc Livre (não encapsulada) nas nanopartículas, respectivamente.

4.3.4 Estabilidade das Nanopartículas

A análise de estabilidade das nanopartículas foi determinada através do equipamento LUMiSizer (LUM GmbH, Berlim, Alemanha). No equipamento, uma luz no comprimento de onda de 865 nm ilumina toda a célula contendo a amostra, e é feito a medida de transmissão da luz em função do tempo enquanto uma força gravitacional é aplicada, acelerando assim os fenômenos de instabilidade como sedimentação, agregação, coagulação, floculação ou cremação (formação do *creaming*) (CAVALCANTE et al., 2020). Inicialmente, 200 μ L das nanopartículas foram colocados em um tubo de policarbonato e centrifugadas a 528,8 g (2000 rpm), a luz transmitida foi medida por 12 horas a 25 °C. A partir do gráfico de integração da porcentagem de transmitância em função do tempo, obteve-se o índice de instabilidade.

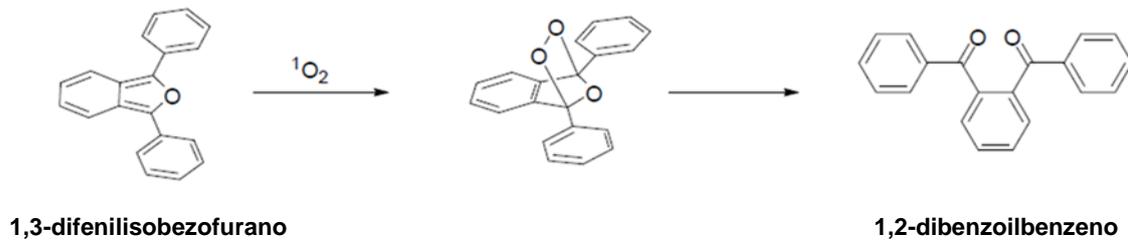
4.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA

A capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ da CIAIPc livre e encapsulada foi medida através da fotoxidação do supressor químico DPBF (TISOCO et al., 2022) em um solvente aprótico (DMSO). Num típico ensaio de fotodegradação do DPBF (EBANI et al., 2021) misturou-se 1,75 mL de DPBF ($100 \mu\text{mol L}^{-1}$ em DMSO), 1,65 mL de DMSO e 0,1 mL das nanopartículas contendo CIAIPc ou 0,1 mL da CIAIPc livre ($7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em etanol). Também realizou-se o experimento na presença da ZnPc livre ($7,5 \mu\text{mol L}^{-1}$ em THF), o qual serviu como padrão para determinar o Φ_{Δ} da CIAIPc livre.

Na presença do fotossensibilizador e luz laser de comprimento de onda apropriado, o DPBF reage com o $^1\text{O}_2$ gerado no meio, gerando o composto incolor 1,2-dibenzoilbenzeno (Figura 7), como consequência, observa-se com o passar do tempo o decaimento do pico de absorção do DPBF em 417 nm. Após a leitura inicial do espectro de absorbância, as amostras foram irradiadas com diferentes tempos de laser de diodo de baixa potência, de comprimento de onda de 660 nm (Thera Lase – DMC, São Carlos, SP, Brasil) e potência útil do emissor de 30 mW (ou $3,52 \times 10^{18}$ fótons $\text{cm}^{-2} \text{s}^{-1}$) posicionado a 1 cm das amostras. Da mesma maneira a análise foi

realizada com as nanopartículas em branco, a única diferença foi a utilização de 30 segundos de intervalo na irradiação do laser, com tempo total de 150 segundos.

Figura 7 – Esquema da fotodegradação do DPBF provocada pelo $^1\text{O}_2$.



Fonte: adaptado de GOBO (2013).

A constante cinética de fotodegradação do DPBF (k) foi obtida através da aplicação do modelo cinético de primeira ordem, descrito na Equação 2, e o rendimento quântico de $^1\text{O}_2$ (ϕ_Δ) foi calculado pela Equação 3 (SPESIA; MILANESIO; DURANTINI, 2008):

$$\ln \frac{A_0}{A_t} = kt \quad (2)$$

Onde A_0 e A_t correspondem à absorvância do DPBF no tempo zero e no tempo variável t , respectivamente.

$$\phi_\Delta = \phi_\Delta^\circ \cdot \frac{k}{k_{\text{std}}} \quad (3)$$

k_{std} e k correspondem a constante de fotodegradação do DPBF na presença da CIAIPc livre e encapsulada, respectivamente, e ϕ_Δ° é o valor padrão de rendimento quântico de oxigênio singleto da CIAIPc livre. A ZnPc em DMSO ($\phi_\Delta^\circ = 0.67$)

(DURMUŞ; NYOKONG, 2007) foi usada como padrão para determinar o ϕ_{Δ}° da CIAIPc livre.

4.5 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O ensaio de liberação *in vitro* foi realizado empregando-se o método do saco de diálise, foram testados dois meios de liberação: (i) mistura tampão ácido acético/acetato de sódio e DMF (20:80 v/v) em pH = 5,4 (EBANI, et al., 2021); (ii) tampão PBS 10 mmolL⁻¹ com 40 mmolL⁻¹ de SDS em pH = 7,4 (SCHUENCK-RODRIGUES, et al., 2020). Neste típico experimento de cinética de liberação, uma alíquota de 1 mL das nanopartículas contendo CIAIPc foi colocada no saco de diálise (Sigma Aldrich, peso molecular cut-off 14,000 Da, membrana de celulose, largura plana média de 33 mm) e mergulhada em 10 mL do meio de liberação. O sistema foi mantido sob agitação constante à temperatura de 37 °C. Em determinados intervalos de tempo foram coletadas alíquotas do meio externo para a quantificação da CIAIPc pelo método de fluorescência. Após cada quantificação devolveu-se as alíquotas para o sistema, a fim de manter o volume do meio aproximadamente constante. A intensidade de fluorescência das amostras foi utilizada para calcular a concentração da CIAIPc liberada em cada intervalo de tempo. Para avaliar o perfil de liberação da CIAIPc encapsulada nas nanopartículas utilizaram-se seis modelos matemáticos (ordem zero, primeira ordem, biexponencial, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hixon Crowell) (EBANI et al., 2021; KAMALY et al., 2016; LI et al., 2017; MORGULCHIK; KAMALY, 2021; VILLETTI et al., 2021), apresentados na Tabela 1.

Tabela 2 – Modelos matemáticos utilizados para analisar o perfil de liberação da CIAIPc nas nanopartículas.

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

4.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os experimentos foram realizados em triplicata ($n = 3$), os resultados foram expressos como média \pm DV (Desvio Padrão). A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se a análise de variância simples (ANOVA), utilizou-se o teste Tukey nas comparações realizadas, com um grau de confiança de 5 % ($p < 0,05$), os cálculos foram realizados no programa Origin 8.5.

4.7 VIABILIDADE CELULAR

4.7.1 Nematódeos: Cultura e Tratamento

A linhagem *Caenorhabditis elegans* Bristol N2 (tipo selvagem), fornecida pelo *Caenorhabditis* Genetics Center (University of Minnesota, Twin Cities, MN, USA) foi utilizada e mantida à 20 °C em placas de Petri com NGM (do inglês “*Nematode Growth Medium*”) e *Escherichia coli* OP50, as quais servem de alimento para os vermes. Para obter vermes no estágio L1, populações de adultos hermafroditas grávidos foram tratadas com solução de lise (200 μ L de NaOH 10 μ molL⁻¹ + 800 μ L de hipoclorito de sódio + 1 mL de H₂O) como descrito por Porta-De-La-Riva e colaboradores (2012). Os ovos foram deixados durante a noite em tampão M9 (0,3% KH₂PO₄, 0,6% Na₂HPO₄, 0,5% NaCl). Após 14 horas, os ovos eclodiram e liberaram os primeiros vermes larvais (L1), os quais foram utilizados nos ensaios. Todas as etapas foram realizadas a uma temperatura controlada de 20°C.

4.7.2 Exposição

150 vermes foram expostos durante 1 hora às nanopartículas, utilizando volumes de 100, 200 e 400 μ L. Em seguida, os vermes foram transferidos para as placas contendo NGM e *E. coli* OP50 e mantidos em incubadora à 20 °C por 24 horas. A sobrevivência foi analisada conforme estabelecido por Park e colaboradores (2017),

a partir da observação dos nematódeos com o auxílio do microscópio estéreo, no qual, vermes não responsivos ao toque do lápis foram caracterizadas como mortas. Os experimentos foram feitos em duplicatas e repetidos pelo menos três vezes.

4.7.3 Análises do Desenvolvimento Larval

A verificação do desenvolvimento das cepas larvais é vastamente utilizado em ensaios toxicológicos de nanopartículas (BOSCH et al., 2018; HU et al., 2018) e define-se pela análise do tamanho corporal dos vermes, o qual verifica se os nanocarreadores em estudo deixados em exposição aos vermes retardam o seu desenvolvimento larval, ainda que não interfiram na sobrevivência. Para realização da análise, 10 vermes de cada grupo foram paralisados usando uma mistura contendo 10 μL de solução de levisole ($57,84 \mu\text{molL}^{-1}$) e 10 μL de H_2O , os nematódeos foram fotografados a partir de um microscópio ótico (modelo Olympus SZ2-LGB). O comprimento dos vermes foi medido da cabeça à cauda usando o software ImageJ. Experimentos independentes foram repetidos pelo menos três vezes ($n = 30$ animais por grupo).

4.7.4 Rastreamento *in vivo* das nanopartículas nos animais

Este ensaio é muito importante para confirmar a ingestão das nanopartículas pelos nematódeos. Para as imagens de fluorescência, 150 vermes foram tratados em meio líquido com 200 μL das nanopartículas (MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc, e NE@CIAIPc) durante 1 h. Os nanocarreadores apresentam fluorescência vermelha devido à presença da CIAIPc. Após a exposição dos grupos, os nematódeos foram lavados quatro vezes com o tampão M9, na sequência, os vermes foram imobilizados numa placa de ágar com uma solução de azida de sódio ($50 \mu\text{molL}^{-1}$). As imagens de fluorescência vermelha dos *Caenorhabditis elegans* Bristol N2 foram capturadas com o Microscópio Confocal Olympus® Fluoview FV10i (excitação: 559 nm e emissão: entre 615 e 670 nm).

4.7.5 Análise Estatística da Viabilidade Celular

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 (dados não paramétricos), utilizou-se os testes pós-hoc de Kruskal-Wallis e Dunn. A análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo teste de comparação múltipla de Tukey como pós-hoc foi realizada para os dados paramétricos. A obtenção de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativa.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DOS SISTEMAS NANOESTRUTURADOS

A utilização da terceira geração de fotossensibilizadores emerge como uma estratégia promissora para solucionar as limitações relacionadas ao uso de fotossensibilizadores hidrofóbicos e para aumentar a sua resposta fototerapêutica. Este trabalho visa avaliar as propriedades das nanopartículas de MH-*b*-PMMA@CIAIPc visando sua aplicação na PDT. O uso do copolímero em bloco MH-*b*-PMMA é adequado para preparar novos nanocarreadores devido ao fato deste se auto-organizar em um solvente específico formando micelas poliméricas (estrutura corona-núcleo). Além disso, a presença da unidade de oligossacarídeo na coroa das nanoestruturas pode melhorar a absorção celular devido aos receptores específicos de açúcar nas células cancerígenas, as quais requerem mais energia do que uma célula normal (OTSUKA et al., 2013b; ZEPON et al., 2015). Em estudos anteriores, foi demonstrado que células cancerígenas de MCF-7 exibiram uma super expressão dos transportadores de glicose (ZENG et al., 2020), o que poderia proporcionar uma via de entrada preferencial para nanopartículas à base de açúcar, como observado para os dendrímeros à base de PAMAM ((poli) amido aminas) modificados com glicose e carregados com doxorubicina (SZTANDERA et al., 2019). Portanto, é esperado que as nanopartículas de MH-*b*-PMMA@CIAIPc possam ser internalizadas mais eficientemente pelos receptores de células cancerosas, aumentando assim a eficácia terapêutica da PDT.

Neste trabalho, foi utilizada a mistura de acetona/água (4:1 m/m) para dispersar o copolímero em bloco MH-*b*-PMMA e para preparar as micelas poliméricas. Nesta proporção, a mistura mostrou-se como um bom solvente para ambos os blocos do copolímero, uma vez que o gráfico de dispersão da intensidade da luz, $I(q)$, versus a composição mostrou um valor mínimo (ZEPON et al., 2015, 2016). Considerando que a $I(q)$ é proporcional ao produto da concentração do copolímero e à massa molar do agregado no regime diluído, o menor valor de $I(q)$ pode ser associado a dissociação dos agregados de MH-*b*-PMMA em cadeias únicas (cadeias moleculares). Segundo

Zepon e colaboradores (2016), as cadeias únicas de MH-*b*-PMMA têm um raio hidrodinâmico de 4,1 nm numa mistura de acetona/água (3,9:1,1 m/m) na concentração de 1 g L⁻¹ a 25 °C, o que é consistente com o valor teórico de 3,6 nm calculado com base na distância média de ponta a ponta de uma cadeia polimérica não perturbada ($r = \ell \cdot \sqrt{N}$, onde ℓ é o comprimento de uma unidade repetitiva ($\ell_{\text{PMMA}} \approx 0,3$ nm e $\ell_{\text{MH}} \approx 0,5$ nm) e N é o número de unidades repetitivas) (FELDMAN, 1984; ZEPON et al., 2015, 2016).

As nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc foram obtidas usando o método de nanoprecipitação padrão, onde várias formulações foram testadas, variando-se a concentração do copolímero em bloco, a concentração do CIAIPc, a quantidade do óleo Labrathec, a velocidade de rotação e a temperatura de rotoevaporação. Estudos anteriores do grupo LEPOL/UFMS mostraram que a utilização do método de nanoprecipitação reversa leva a formação de nanopartículas de MH-*b*-PMMA, com raio hidrodinâmico elevado e com aspecto opalescente. Este resultado comprova que o método de preparação das nanopartículas tem grande influência nas propriedades físico-químicas dos sistemas nanoestruturados.

Os três nanocarreadores preparados neste trabalho apresentaram um aspecto homogêneo macroscopicamente e demonstraram uma boa estabilidade ao longo do tempo. As micelas poliméricas MH-*b*-PMMA@CIAIPc exibiram um aspecto transparente, enquanto que as nanopartículas PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc apresentaram um aspecto opalescente (Figura 8). De acordo com o efeito Tyndall, pode-se sugerir que a MH-*b*-PMMA@CIAIPc tem um tamanho menor do que a PCL@CIAIPc e a NE@CIAIPc. Além disso, todas as nanopartículas exibiram uma aparência azulada devido à presença do fotossensibilizador.

O comportamento hidrodinâmico dos nanocarreadores foi avaliado através da técnica de espalhamento de luz (DLS) e o potencial zeta pelas medidas de mobilidade eletroforética. Em meio aquoso e à temperatura de 25 °C, os sistemas nanoestruturados apresentaram uma curva de distribuição de tamanho monomodal e uma relativamente estreita distribuição de tamanho, indicando um baixo índice de polidispersão (Apêndice A). Um comportamento semelhante foi observado para as nanopartículas em branco (Apêndice A). Os valores de R_h , PDI e potencial zeta estão resumidos na Tabela 2. Além disso, as imagens AFM (Figura 9) mostraram que as

nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc possuem formato esférico, com tamanho menor do que os obtidos por DLS, devido à ausência da esfera de solvatação. Além disso, a ausência de grandes agregados nas imagens de AFM comprova que as nanopartículas de MH-*b*-PMMA@CIAIPc têm uma distribuição monomodal, conforme observado através do DLS.

Figura 8 – Aspecto visual das nanopartículas: (a) MH-*b*-PMMA@CIAIPc, (b) PCL@CIAIPc e (c) NE@CIAIPc.

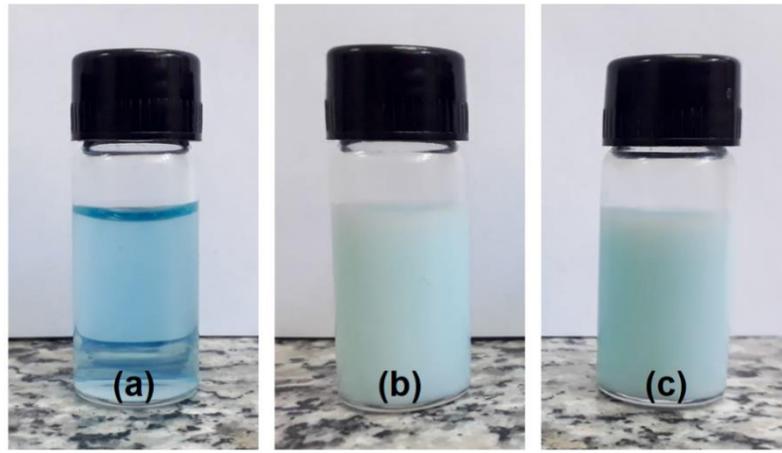


Figura 9 – Imagem de AFM obtida para as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc.

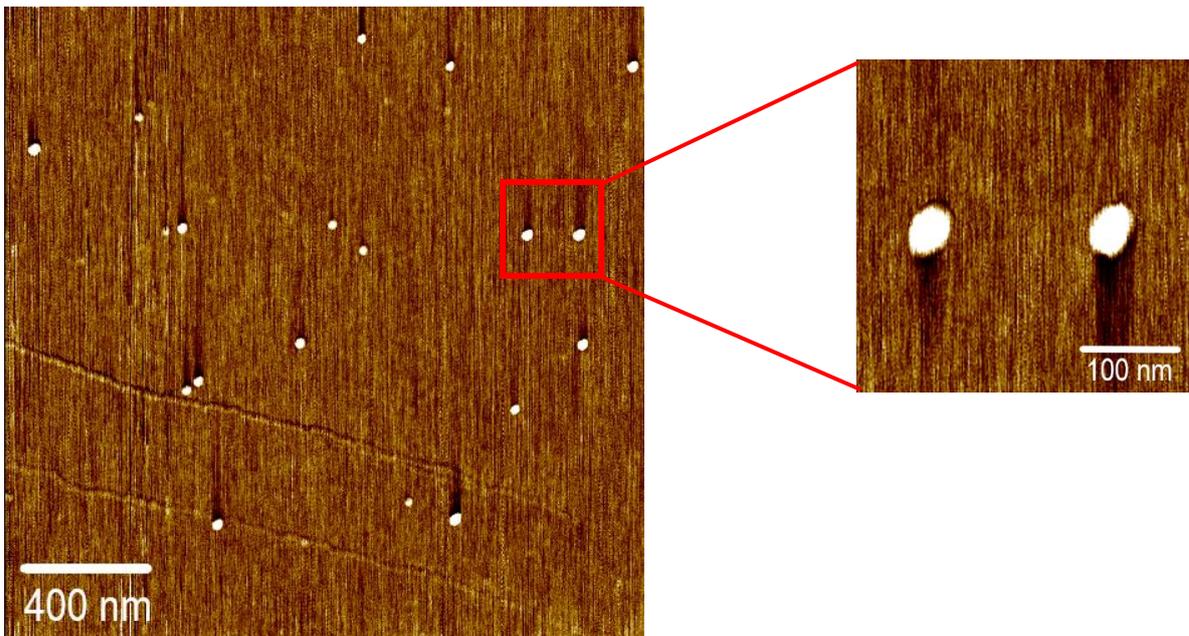


Tabela 3 – Resultados das análises físico-químicas das nanopartículas.

	R_h (nm)	PDI	ξ (mV)	CF (μmolL^{-1})	EE %
MH-<i>b</i>-PMMA@CIAIPc	41 ± 0,9	0,184 ± 0,048	- 29,0 ± 1,10	1,89 ± 0,15	99,91 ± 0,04
MH-<i>b</i>-PMMA@branca	51 ± 1,1	0,099 ± 0,025	- 27,5 ± 1,05	-	-
PCL@CIAIPc	93 ± 3,5	0,093 ± 0,006	- 32,1 ± 1,76	1,89 ± 0,12	99,87 ± 0,02
PCL@branca	97 ± 0,9	0,102 ± 0,013	- 30,5 ± 1,13	-	-
NE@CIAIPc	100 ± 3,6	0,129 ± 0,011	- 33,9 ± 2,92	1,93 ± 0,10	99,97 ± 0,05
NE@branca	101 ± 2,2	0,165 ± 0,010	- 35,7 ± 0,96	-	-

Como se pode ser observado na Tabela 2, todos os sistemas nanoestruturados apresentaram um elevado valor em módulo de potencial zeta, o que indica uma boa estabilidade termodinâmica das dispersões coloidais, e não houve diferença significativa entre as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc ($p > 0,05$). Além disso, os valores de potencial zeta da CIAIPc carregada nas nanoestruturas não foi significativamente diferente das suas respectivas nanopartículas em branco ($p > 0,05$). Além disso, todos os nanocarreadores apresentaram baixos valores de PDI, indicando uma estreita distribuição de tamanho, confirmando uma boa homogeneidade das dispersões.

As nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc mostraram um tamanho menor quando comparadas com os sistemas PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc ($p < 0,05$). Estes resultados explicam a diferença visual na aparência dos nanocarreadores. Cabe salientar que a natureza, a concentração e peso molecular do polímero, o tipo de surfactante, a polaridade do solvente e o processo de preparação das nanopartículas têm fundamental influência nas propriedades físico-químicas dos sistemas nanoestruturados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). O menor tamanho obtido para as nanopartículas de MH-*b*-PMMA@CIAIPc quando comparado com a PCL@CIAIPc pode ser atribuído tanto ao menor raio hidrodinâmico (4,1 nm) como à massa molecular do copolímero em bloco em comparação à PCL. Em relação a NE@CIAIPc, a menor quantidade de copolímero em bloco utilizado na formulação quando comparado com a quantidade utilizada de tensoativos pode explicar este resultado.

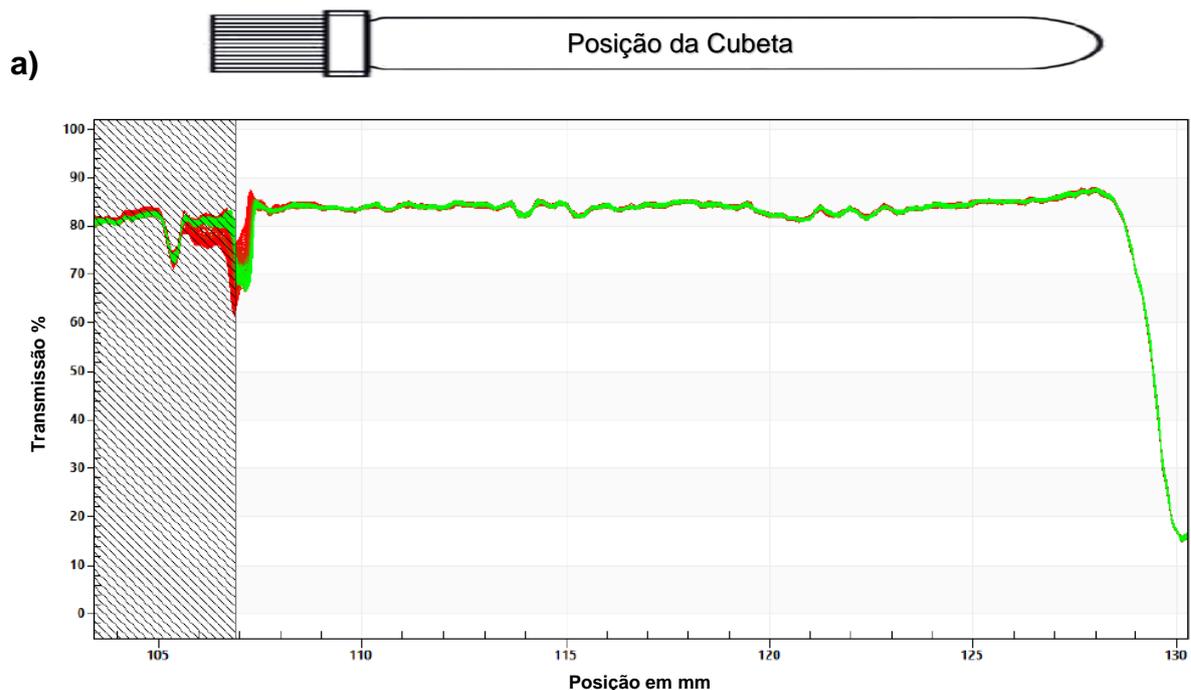
Analisando os valores da Tabela 2, verifica-se que não há diferença no tamanho entre as nanocápsulas e as nanoemulsões com as suas respectivas nanopartículas em branco ($p > 0,05$). Por outro lado, foi observada uma diferença significativa entre a MH-*b*-PMMA@CIAIPc e sua nanopartícula em branco ($p < 0,05$), demonstrando que a presença do fotossensibilizador altera o tamanho das micelas poliméricas. Com base nestes resultados, considera-se que devido à alta hidrofobicidade da CIAIPc, esta substância interage fortemente com o bloco hidrofóbico (PMMA) do copolímero, resultando dessa forma a diminuição do tamanho das micelas poliméricas carregadas em relação as micelas em branco. Trabalhos recentes mostraram que a presença do fármaco pode diminuir (MH-*b*-PS@Tamoxifen) (VILLETTI et al., 2021), não mudar (MH-*b*-PI@Curcumina) (CALDAS et al., 2020) ou aumentar (MH-*b*-PCL@Progesterona) (GRANADA et al., 2017) o tamanho das micelas poliméricas de copolímero em bloco à base de açúcar quando comparado com as suas nanopartículas em branco. Estes resultados revelam que o tamanho e hidrofobicidade do bloco polimérico localizado no núcleo, a presença ou ausência de óleo, e o método de preparação (nanoprecipitação padrão ou reversa) desempenham um papel importante nas propriedades físico-químicas das gliconopartículas.

Os valores de eficiência de encapsulamento e de conteúdo de fotossensibilizador estão apresentados na Tabela 2. Os sistemas nanoestruturados mostraram valores elevados de EE, e não houve diferença significativa entre eles ($p > 0,05$). Em trabalhos anteriores, também foram obtidos valores elevados de EE para a CIAIPc carregada em micelas poliméricas de PS-*b*-PAA (EE = 95%) (VILSINSKI et al., 2018) e PEO-*b*-PPO-*b*-PEO (EE superior a 90%) (PY-DANIEL et al., 2016). O conteúdo de fármaco carregado nos sistemas nanoestruturados foi de 1,89 a 1,93 μmolL^{-1} e não houve diferença significativa entre as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc ($p > 0,05$).

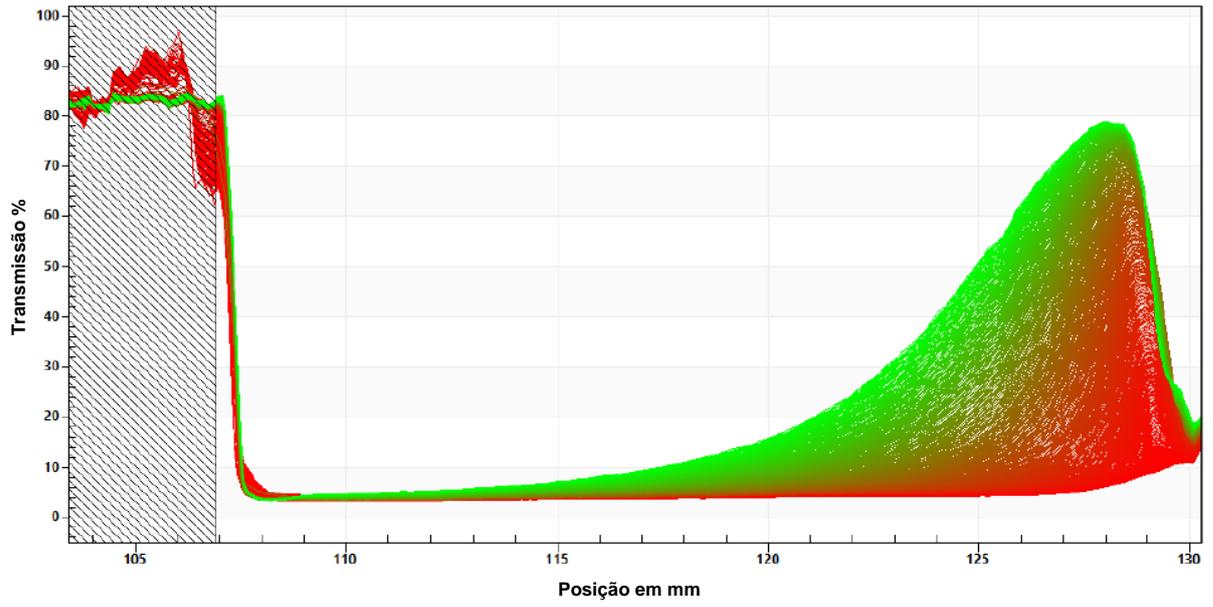
O conhecimento da estabilidade de nanopartículas ao longo do tempo sob diferentes condições ambientais é essencial na nanomedicina (CAVALCANTE et al., 2020; SOBISCH; LERCHE, 2008). Uma dispersão é considerada estável quando é capaz de resistir a mudanças nas suas propriedades físico-químicas ao longo do tempo (KHAN et al., 2011). As análises de LUMiSizer fornecem a porcentagem de luz transmitida em função do tempo para cada posição da amostra na cubeta após ter sido exposta a um campo centrífugo. A alteração no perfil de transmitância descreve

o movimento na interface entre duas fases: a fase dispersa e o sedimento ou a fase dispersa e o *creaming* (LERCHE, 2002). Os resultados das análises de LUMISizer para MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc são mostrados na Figura 10. Como pode ser observado, as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc são mais estáveis do que a PCL@CIAIPc e a NE@CIAIPc, uma vez que ao longo do tempo (12 h) não houve alteração no seu perfil de transmitância (linhas verdes e vermelhas). Estes resultados demonstraram que para a MH-*b*-PMMA@CIAIPc não ocorreu separação de fases, ou seja, as nanopartículas resistiram à aplicação do campo centrífugo. Analisando os perfis de transmitância da PCL@CIAIPc e da NE@CIAIPc, foi observada uma grande diferença na transmitância da luz ao longo do tempo, indicando a separação de fases para estes sistemas. Além disso, para a PCL@CIAIPc e a NE@CIAIPc, observou-se que na posição da célula de policarbonato entre 125 e 130 mm (parte inferior da cubeta) a transmitância de luz das amostras é elevada, indicando uma fase mais transparente quando comparada com a fase superior, sugerindo um fenômeno de desestabilização por *cremeação*, como pode-se observar no aspecto visual das nanopartículas (parte superior da célula) (Figura 11).

Figura 10 – Perfil de transmissão da luz em função do tempo, para cada posição da amostra na cubeta a 25 °C, para as nanopartículas (a) MH-*b*-PMMA@CIAIPc, (b) PCL@CIAIPc e (c) NE@CIAIPc. A escala de tempo está representada pelas linhas vermelhas e verdes.



b)



c)

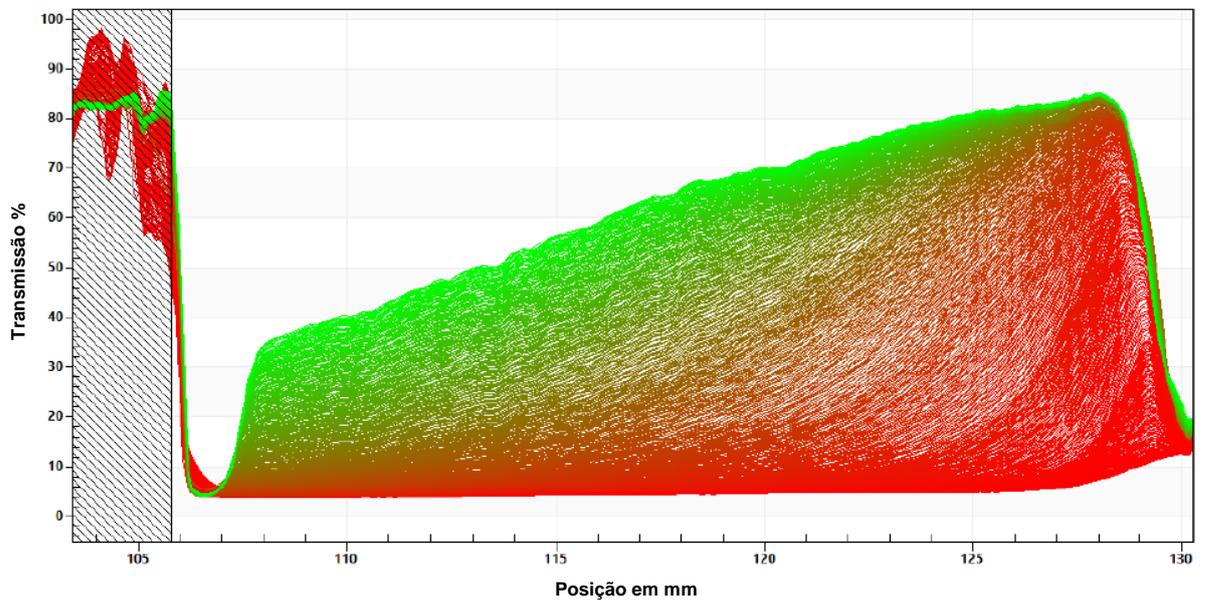
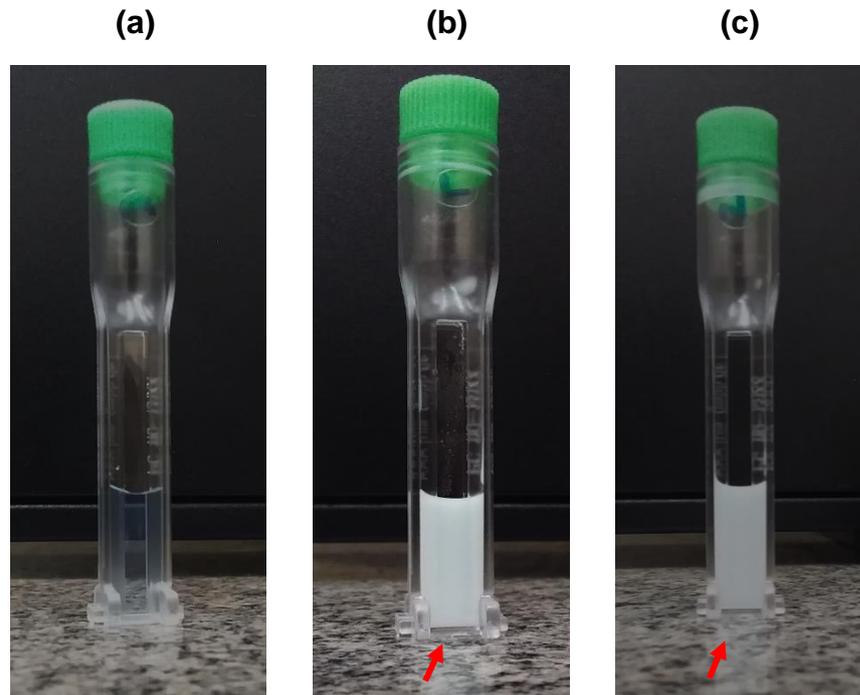


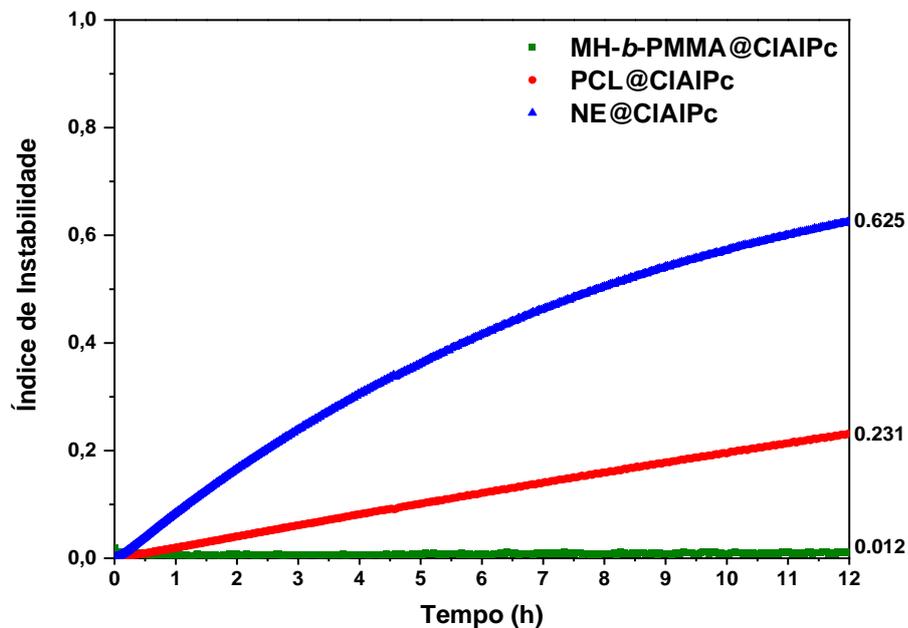
Figura 11 – Aspecto visual das nanopartículas (a) MH-*b*-PMMA@CIAIPc, (b) PCL@CIAIPc e (c) NE@CIAIPc após a centrifugação por LUMiSizer.



O LUMiSizer fornece o gráfico do índice de instabilidade em função do tempo, o que indica a cinética de desestabilização dos sistemas. A velocidade da separação de fases é determinada pela inclinação das curvas em cada ponto (coeficiente angular) (SOBISCH; LERCHE, 2008). Como se pode ver na Figura 12, as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc são estáveis ao longo do tempo, uma vez que a inclinação da curva é próxima de zero. Por outro lado, os sistemas PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc são instáveis ao longo do tempo, uma vez que a inclinação das curvas é elevada. Baixos valores de índice de instabilidade (próximos de zero) indicam uma boa estabilidade termodinâmica das dispersões coloidais, em contraste, valores de índice de instabilidade próximos de 1 indicam a instabilidade dos sistemas (LERCHE, 2002; LIU et al., 2016). Para as nanoestruturas MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc, os índices de instabilidade obtidos foram de 0,012, 0,231 e 0,625, respectivamente. Portanto, a ordem de estabilidade dos sistemas é MH-*b*-PMMA@CIAIPc >> PCL@CIAIPc > NE@CIAIPc. Analisando esses valores, verifica-se que as micelas poliméricas são 19 vezes mais estáveis do que as nanocápsulas e 52 vezes mais estáveis que as nanoemulsões. Embora os nanocarreadores tenham aproximadamente os mesmos valores de potencial zeta, a maior estabilidade da MH-

b-PMMA@CIAIPc quando comparado com a PCL@CIAIPc e a NE@CIAIPc pode ser atribuída ao seu menor tamanho e à baixa interação entre as partículas devido à elevada esfera de solvatação na corona das micelas poliméricas. A maltoheptaose forma ligações de hidrogênio com a água criando uma grande esfera de solvatação em torno das gliconanopartículas, o que dificulta a agregação devido a um grande impedimento estérico. De acordo com Cavalcante e colaboradores (2020), cada hora de análise no LUMiSizer sem alteração no perfil de transmitância corresponde a 3 meses de vida útil dos nanocarreadores. Nas nossas análises de LUMiSizer, as nanopartículas foram expostas a um campo centrífugo durante 12 h, e para a MH-*b*-PMMA@CIAIPc não houve alterações no seu perfil de transmitância, sugerindo então que estas nanopartículas devem ser estáveis durante pelo menos 3 anos. Estes resultados destacam um grande potencial de utilização das nanopartículas de MH-*b*-PMMA@CIAIPc na nanomedicina.

Figura 12 – Gráfico de índice de instabilidade em função do tempo para as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc. Os valores de índice de instabilidade sinalizados no gráfico correspondem ao tempo total de experimento (12 h).



5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE FOTODINÂMICA

O sucesso da PDT depende da capacidade do fotossensibilizador de gerar espécies citotóxicas, tais como o oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$). Essas espécies irão causar um estresse oxidativo na célula em tratamento e conseqüentemente causarão danos a estrutura e morte celular (CHEN, et al., 2017). Neste trabalho, o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ_Δ) dos sistemas nanoestruturados foi avaliado pelo método de fotodegradação do supressor químico DPBF em um solvente aprótico (DMSO). Esse método é amplamente conhecido na literatura, e tem sido usado para determinar a geração de $^1\text{O}_2$ a partir de fotossensibilizadores carregados em sistemas nanoestruturado, tais como micelas (LU et al., 2019), nanocápsulas de PCL (DE SOUZA et al., 2016) e nanopartículas de carboximetilquitosana/líquido iônico (EBANI et al., 2021). A diminuição da banda de absorção de DPBF em 417 nm reflete a geração de $^1\text{O}_2$ pela reação fotoquímica do tipo II, uma vez que as reações do tipo I tendem a ocorrer em meios com baixos níveis de $^3\text{O}_2$ (DAI et al., 2012; MFOUYO-TYNGA et al., 2021; PLAETZER et al., 2009). A ampla utilização deste método deve-se principalmente ao fato de que a reação entre o DPBF e o $^1\text{O}_2$ gera o produto 1,2-dibenzilbenzeno, que não absorve na região visível do espectro.

Primeiramente, foi avaliada a fotodegradação do DPBF na presença das nanopartículas em branco (Figuras 13, 14 e 15). Como pode ser observado, houve um pequeno decaimento da banda de absorção do DPBF após 150 s de irradiação com o laser vermelho (1,89% para a MH-b-PMMA@CIAIPc, 1,77% para a PCL@CIAIPc e 3,28% para a NE@CIAIPc), indicando que um pequeno erro inerente ao método foi introduzido na determinação da atividade fotodinâmica. Esses pequenos decréscimos na absorbância não são significantes quando comparados com os sistemas nanoestruturados contendo a CIAIPc (Figura 16), o que comprova que a geração de espécies reativas de oxigênio está associada à presença do fotossensibilizador e não devido aos materiais utilizados na preparação dos nanocarreadores (polímeros ou surfactantes).

Por outro lado, a fotodegradação do DPBF na presença da CIAIPc livre mostrou um rápido decaimento da banda de absorção, como pode ser observado na Figura 16. Esse rápido decaimento da concentração do DPBF pode também ser evidenciado

pela drástica mudança de coloração na solução, de verde para incolor, depois da irradiação com o laser (ver imagem no interior da Figura 16). Vale ressaltar que não ocorre nenhuma reação entre a CIAIPc e o DPBF, visto que a banda-Q de absorção do fotossensibilizador (675 nm) não apresenta alteração durante a execução do experimento. Esses resultados demonstraram-se promissores para o uso da CIAIPc em terapia fotodinâmica, devido a sua boa fotoestabilidade frente a longos períodos de exposição ao laser. Os espectros de duplicata e triplicata estão apresentados no Apêndice C.

Figura 13 – Fotodegradação do DPBF na presença da MH-*b*-PMMA@branca.

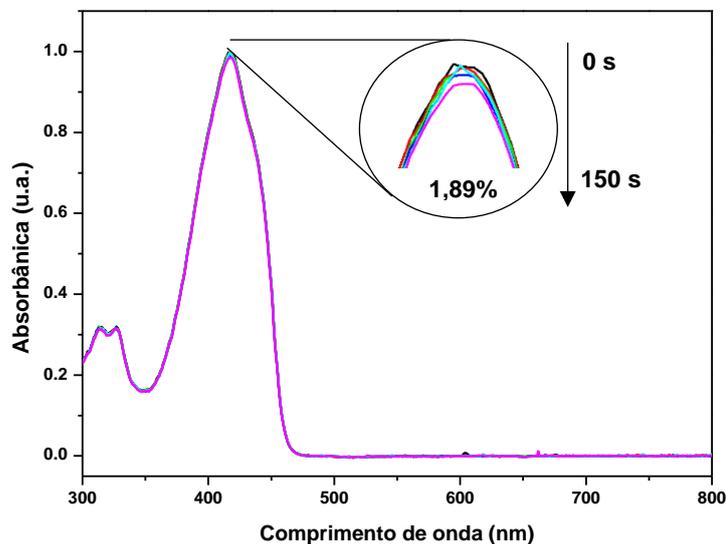


Figura 14 – Fotodegradação do DPBF na presença da PCL@branca.

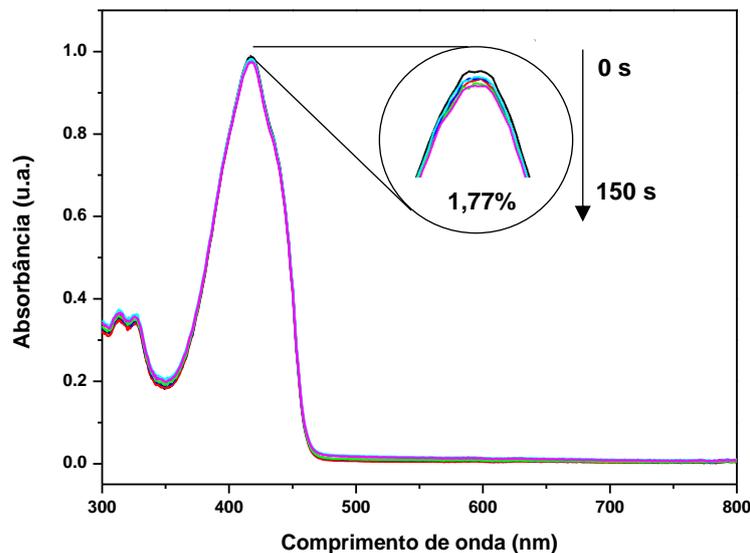


Figura 15 – Fotodegradação do DPBF na presença da NE@branca.

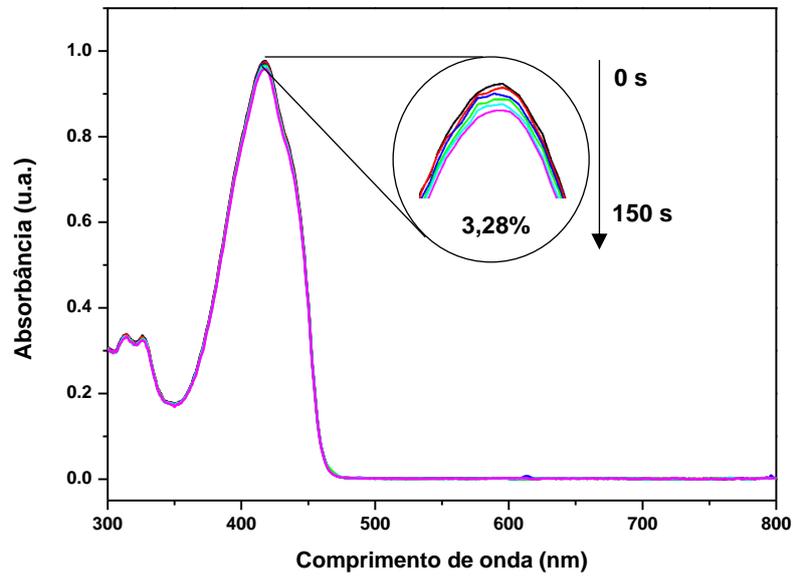
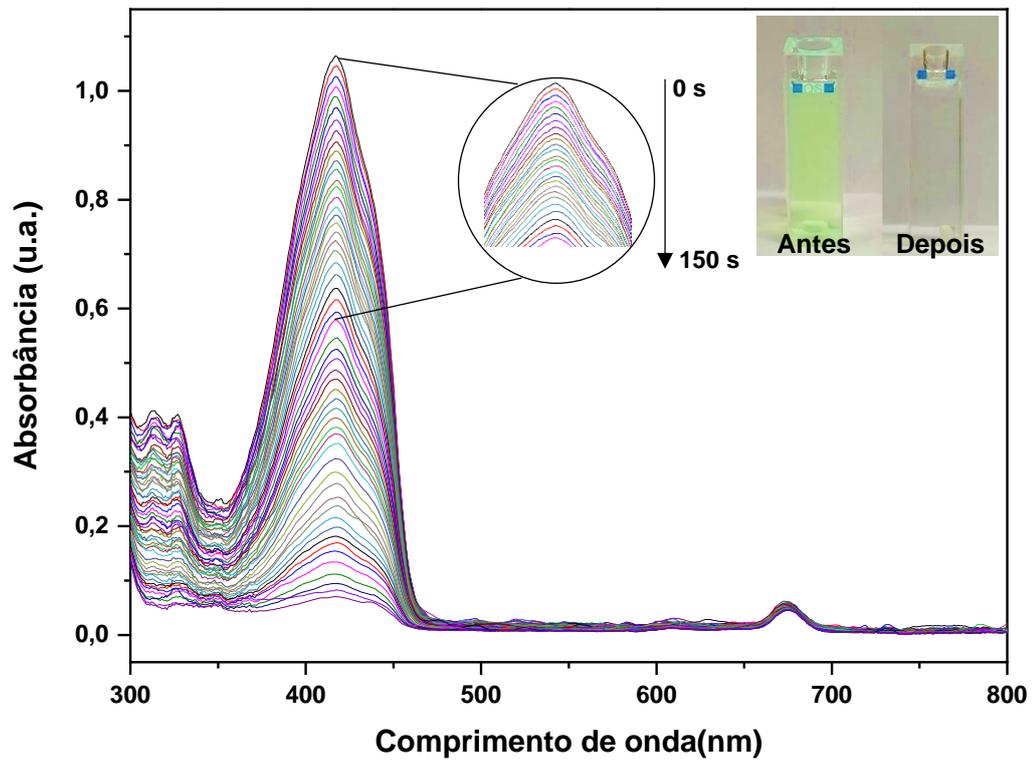


Figura 16 – Fotodegradação do DPBF na presença da CIAIPc livre.



Dando continuidade ao estudo dos sistemas nanoestruturados, avaliou-se a fotodegradação do DPBF na presença das nanopartículas contendo a CIAIPc (MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc) como pode ser visto nas Figuras 17, 18 e 19. Na presença dos sistemas nanoestruturados também ocorre o decaimento da banda de absorção do DPBF, indicando a produção de oxigênio singleto. Além disso, observou-se que a reação de fotodegradação do DPBF segue uma típica cinética de primeira ordem, como pode ser observado na parte interna das Figuras 17, 18 e 19. Os valores das constantes de fotodegradação do DPBF (k), o coeficiente de determinação (R^2) e o rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_{Δ}) estão apresentados na Tabela 3. A cinética de primeira ordem observada neste trabalho concorda com o mecanismo proposto por Herath e colaboradores (2005), o qual envolve seis etapas:

Etapa 1: ativação do fotossensibilizador (FS).



Etapa 2: cruzamento intersistema (CI: singleto \rightarrow tripleto)



Etapa 3: formação de oxigênio singleto.



Etapa 4: fotodegradação 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 (Equação 10) e para a lei de velocidade de formação da $^1FS^*$ e 3FS obtemos a Equação 11.

$$\frac{d}{dt} [^1O_2] = k_{\Delta} \cdot [^3FS^*] \cdot [^3O_2] - (k_q + k_f) \cdot [DPBF] \cdot [^1O_2] - k_d \cdot [^1O_2] = 0 \quad (10)$$

$$k_{\Delta} \cdot [^3FS^*] \cdot [^3O_2] = I_a \cdot \phi_{\Delta} \quad (11)$$

Para baixas concentrações de DPBF podemos considerar que $(k_q + k_f) \cdot [DPBF] \gg k_d$, e desta maneira chega-se na lei de velocidade para a fotodegradação do DPBF (Equação 12). Rearranjando a Equação 12, chega-se numa típica lei de velocidade de primeira ordem (Equação 14).

$$-\frac{d}{dt} [DPBF] = \frac{I_a \phi_{\Delta} k_q}{k_d} [DPBF] \quad (12)$$

$$\frac{I_a \phi_{\Delta} k_q}{k_d} = k \quad (13)$$

$$-\frac{d}{dt} [DPBF] = k [DPBF] \quad (14)$$

Figura 17 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula MH-*b*-PMMA@CIAIPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação do DPBF.

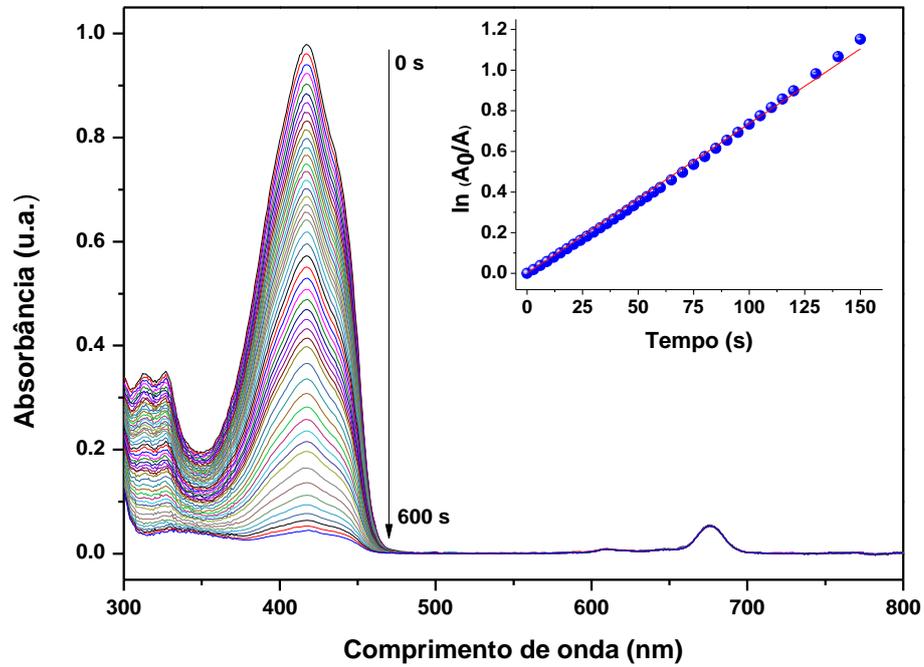


Figura 18 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula PCL@CIAIPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação do DPBF.

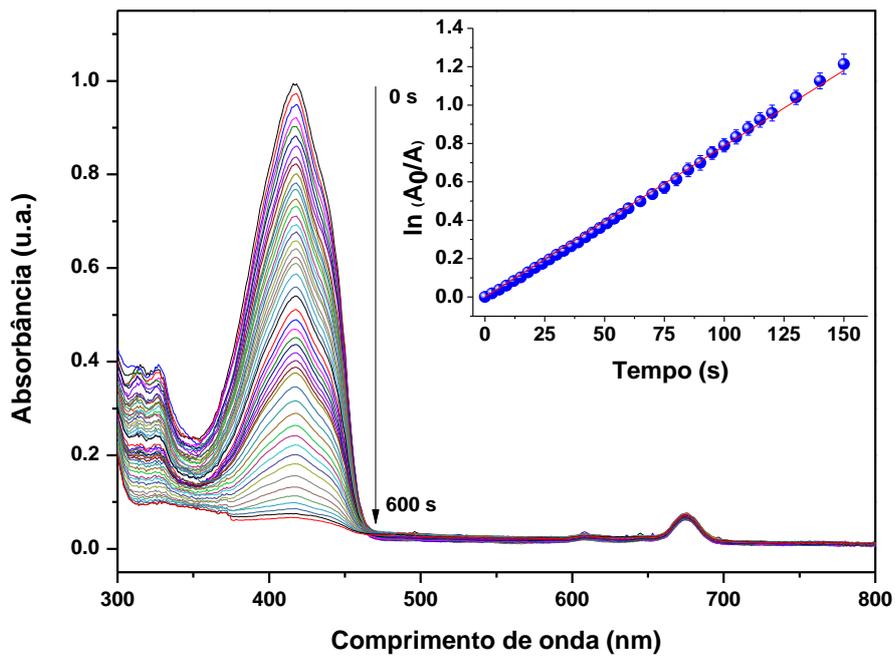


Figura 19 – Fotodegradação do DPBF na presença da nanopartícula NE@CIAIPc. Gráfico interno: cinética de primeira ordem para a degradação do DPBF.

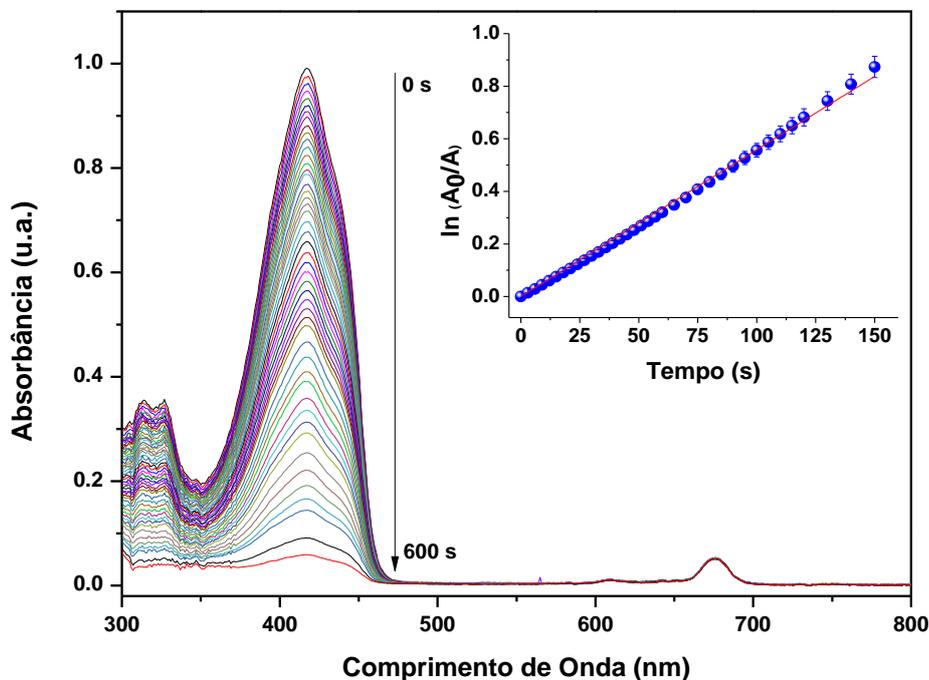


Tabela 4 – Resultados dos experimentos de fotodegradação do DPBF a 25 °C.

	k (s ⁻¹)	R	Φ_{Δ}
ZnPc	$(2,759 \pm 0,12) \times 10^{-2}$	0,9987	0,67 ^a
CIAIPc	$(6,447 \pm 0,59) \times 10^{-3}$	0,9995	0,22 ± 0,02
MH-<i>b</i>-PMMA@CIAIPc	$(7,363 \pm 0,03) \times 10^{-3}$	0,9988	0,25 ± 0,001
PCL@CIAIPc	$(7,520 \pm 0,69) \times 10^{-3}$	0,9989	0,24 ± 0,004
NE@CIAIPc	$(5,697 \pm 0,02) \times 10^{-3}$	0,9989	0,19 ± 0,007

^aValor padrão de Φ_{Δ} de ZnPc em DMSO (DURMUŞ; NYOKONG, 2007).

Analisando os valores de Φ_{Δ} pode-se perceber que as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc e PCL@CIAIPc possuem uma atividade fotodinâmica semelhante à da CIAIPc livre ($p > 0,05$). Contudo, a NE@CIAIPc apresentou um comportamento fotodinâmico inferior aos demais nanocarreadores ($p < 0,05$). Os valores de Φ_{Δ} para a

CIAIPC livre e encapsulada obtidos neste trabalho são semelhantes aos valores encontrados na literatura. Idowu e Nyokong (2007) obtiveram valores de $\Phi_{\Delta} = 0,29$ para a CIAIPc livre em DMSO. Vilsinski e colaboradores (2018) encontraram valores de $\Phi_{\Delta} = 0,3$ para nanopartículas de PS-*b*-PAA contendo CIAIPc. Portanto, pode assumir-se que as nanopartículas preparadas neste trabalho têm um elevado potencial para serem empregadas na PDT devido à sua geração apropriada de oxigênio singleto.

5.3 CINÉTICA DE LIBERAÇÃO *IN VITRO*

O perfil de liberação *in vitro* da CIAIPc contida nas nanopartículas foi avaliado pelo método do saco de diálise, utilizando como meio de liberação a mistura tampão/DMF (20:80 v/v). Há vários fatores que podem afetar a taxa de liberação de fármacos encapsulados através do método de diálise, como por exemplo: (i) a concentração do fármaco dentro das nanoestruturas, (ii) a concentração efetiva da substância ativa dentro do saco de diálise, depois que é liberada dos nanossistemas e (iii) as constantes de taxa de permeação através do nanocarreador e da membrana de diálise (ALMEIDA et al., 2010). A liberação de fármacos a partir de nanopartículas poliméricas pode ocorrer através de diversos mecanismos, como difusão, efeito osmótico ou erosão superficial (KAMALY et al., 2016). A Figura 20 mostra a porcentagem de liberação da CIAIPc encapsulada nos nanossistemas durante o período de 24 horas a 37 °C. A porcentagem de liberação cumulativa da CIAIPc obtida a partir das nanopartículas foi de 74%, 68% e 74% para os sistemas MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc, respectivamente. Na Tabela 4 são apresentados os dados das constantes cinéticas de liberação do fármaco (k) e os coeficientes de determinação (R^2) para os seis modelos matemáticos (ordem zero, primeira ordem, biexponencial, Higuchi, Korsmeyer-Peppas e Hixon Crowel) utilizados na análise do perfil de liberação da CIAIPc. Como pode ser observado, o modelo que melhor descreve os dados experimentais é o biexponencial, pois apresentou valores de R^2 mais próximos a 1. Esse modelo indica uma rápida liberação no estágio inicial (fase I), referido como efeito *burst*, seguida de uma liberação controlada e sustentada do fármaco (fase II) indicando uma lenta difusão da CIAIPc a partir das nanopartículas.

Figura 20 – Perfil de liberação da CIAIPc encapsulada nas nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc. As linhas sólidas correspondem ao modelo biexponencial.

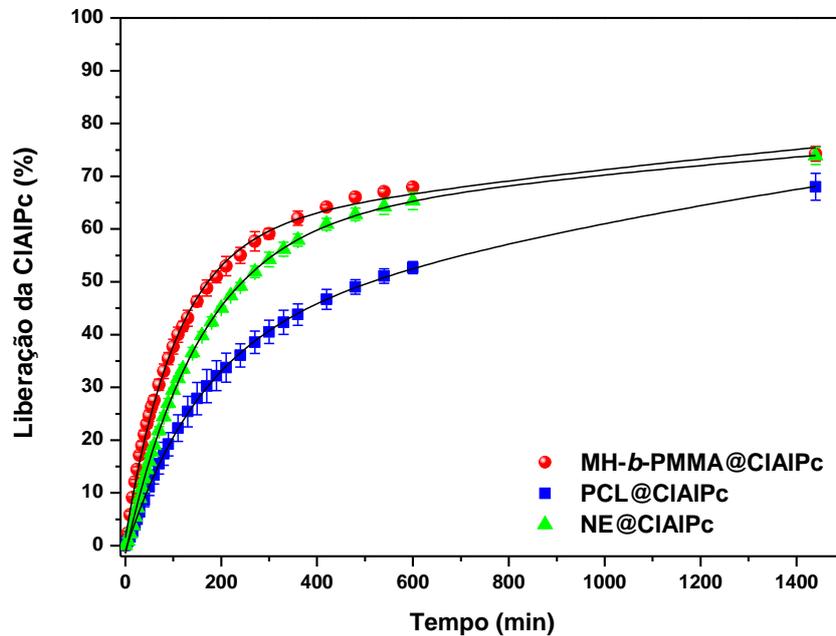


Tabela 5 – Constantes cinéticas de liberação de fármaco (k) e coeficiente de determinação (R^2) para os seis modelos matemáticos utilizados para avaliar o perfil de liberação.

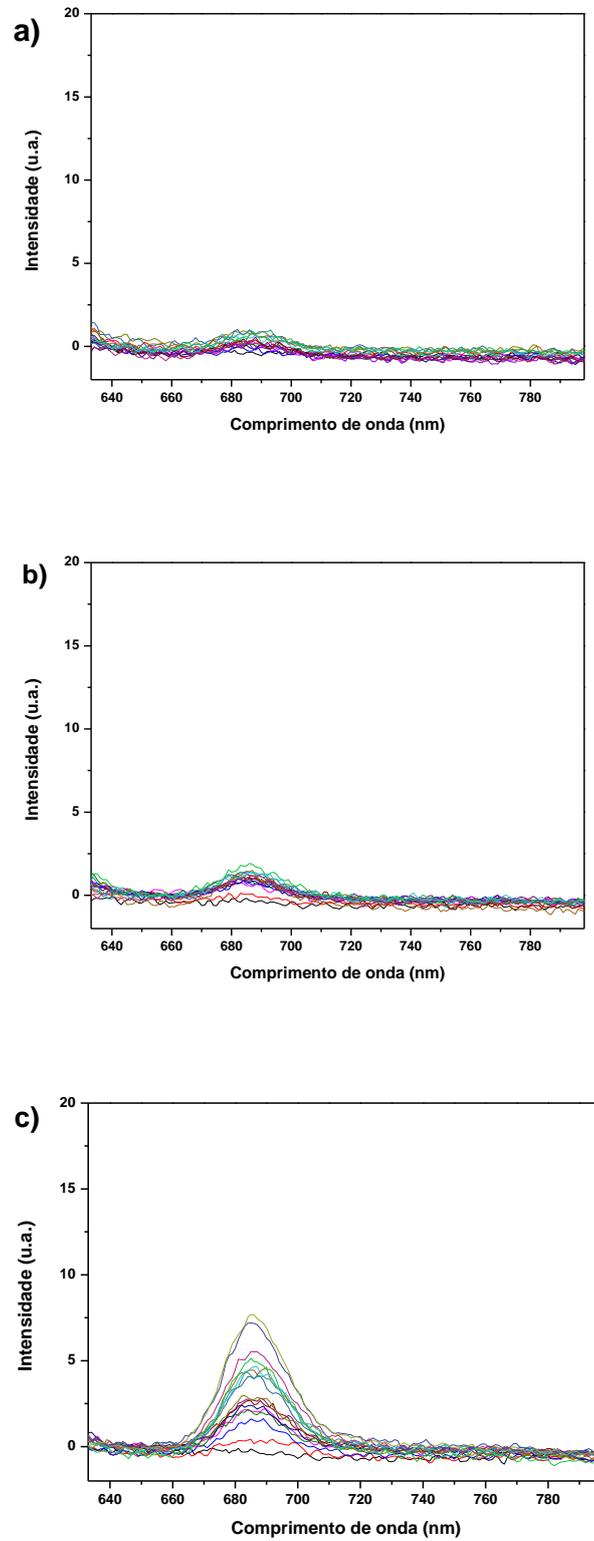
	Ordem Zero		1ª Ordem		Modelo de Higuchi		Modelo Biexponencial			Modelo de Korsmeyer Peppas			Modelo de Hixson Crowell	
	k	R^2	k	R^2	k	R^2	k_1	k_2	R^2	n	k	R^2	k	R^2
							a	b						
MH- <i>b</i> -PMMA@CIAIPc	$1,03 \cdot 10^{-1}$	0,8060	$5,84 \cdot 10^{-2}$	0,7493	3,59	0,9868	$8,72 \cdot 10^{-3}$	$3,62 \cdot 10^{-4}$	0,9991	0,36	6,72	0,9568	$6,77 \cdot 10^{-3}$	0,5920
							0,56	0,44						
PCL@CIAIPc	$7,69 \cdot 10^{-2}$	0,8023	$7,11 \cdot 10^{-2}$	0,6144	2,22	0,9769	$6,37 \cdot 10^{-3}$	$4,54 \cdot 10^{-4}$	0,9998	0,48	2,25	0,9753	$6,98 \cdot 10^{-3}$	0,7426
							0,40	0,60						
NE@CIAIPc	$7,14 \cdot 10^{-1}$	0,8503	$6,84 \cdot 10^{-2}$	0,7587	3,56	0,9830	$6,44 \cdot 10^{-3}$	$3,00 \cdot 10^{-4}$	0,9997	0,44	3,74	0,9535	$7,44 \cdot 10^{-3}$	0,7047
							0,61	0,39						

Analisando os valores das constantes cinéticas do modelo biexponencial, nota-se que as constantes referentes à fase I (k_1) são maiores que as referentes à fase II (k_2), confirmando a rápida liberação da CIAIPc no estágio inicial, seguida de uma liberação controlada e sustentada. Além disso, os coeficientes “a” e “b” deste modelo indicam que em até 24 h, o total de CIAIPc liberado no estágio inicial (a) foi 56%, 40%

e 61% e na fase sustentada (b) foi 44%, 60% e 39% para MH-*b*-PMMA@CIAIPc, PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc, respectivamente. Também pode-se notar que a MH-*b*-PMMA@CIAIPc possui uma liberação mais rápida na fase I quando comparada à PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc. Contudo, na fase II a PCL@CIAIPc apresentou uma liberação mais rápida que a MH-*b*-PMMA@CIAIPc e NE@CIAIPc. Segundo Lima e colaboradores (2021) a liberação do fármaco depende da difusão através da parede de polímero e da erosão da matriz polimérica. Uma possível explicação para a liberação mais rápida da PCL@CIAIPc na fase II pode estar relacionada ao inchamento da matriz polimérica e/ou erosão da matriz em tempos mais longos.

A fim de melhor simular as condições *in vivo*, também foi utilizando como meio de liberação o tampão PBS 10 mmolL^{-1} com 40 mmolL^{-1} de SDS (pH = 7,4), para avaliar o perfil de liberação da CIAIPc a partir das nanopartículas. Este experimento foi acompanhada por 8 dias (192 h). Entretanto, como a CIAIPc é um composto altamente hidrofóbico, não observou-se a liberação do fotossensibilizador a partir dos nanocarreadores. Como pode ser observado nos gráficos de comprimento de onda *versus* intensidade apresentados na Figura 21, percebe-se que a concentração de CIAIPc liberada das nanopartículas é praticamente desprezível, visto que a intensidade de fluorescência máxima não chegou a 10, o que corresponderia a aproximadamente 0,2% da concentração total do fotossensibilizador nos sistemas nanoestruturados. Dessa forma, não foi possível determinar o perfil de liberação da CIAIPc. Entretanto, esses resultados não interferem na atividade fotodinâmica da CIAIPc, pois mesmo encapsulado, o fotossensibilizador foi capaz de produzir oxigênio singlete conforme demonstrado no experimento de fotodegradação do DPBF.

Figura 21 – Perfil de liberação (comprimento de onda *versus* intensidade) em solução tampão de PBS da CIAIPc a partir das nanopartículas (a) MH-*b*-PMMA@CIAIPc, (b) PCL@CIAIPc e (c) NE@CIAIPc após 8 dias de experimento.

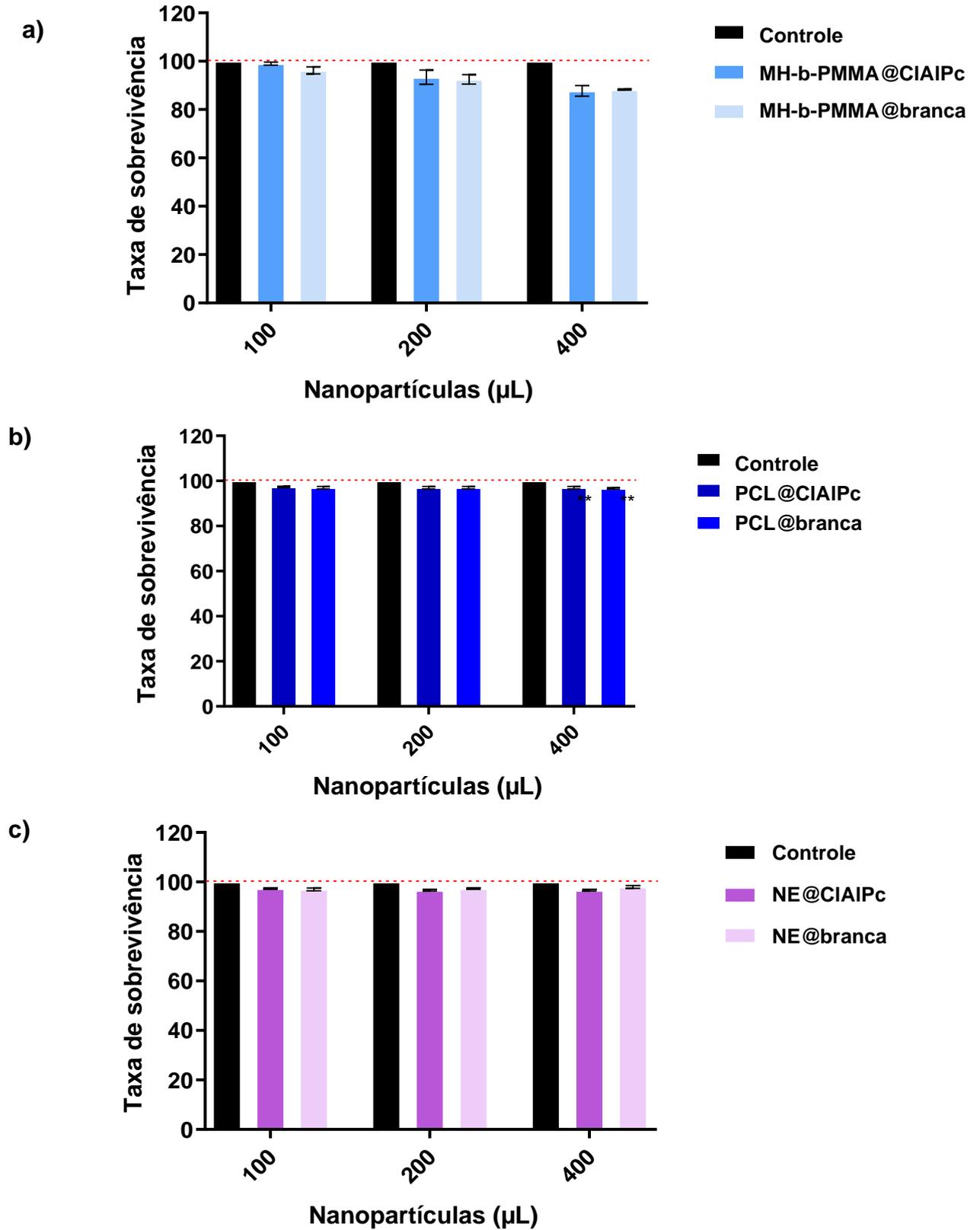


5.4 VIABILIDADE CELULAR E BIODISTRIBUIÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS FRENTE AOS *C. elegans*

Visando o emprego em nanomedicina, torna-se essencial verificar a toxicidade de nanopartículas. O modelo *C. elegans* vem sendo empregado na literatura para avaliar a toxicidade de vários sistemas, incluindo os nanocarreadores (LICHTENBERG et al., 2019; TOLEDO et al., 2019). A vantagem da utilização deste modelo se deve ao fato que os nematoides irão ingerir e/ou incorporar completamente as nanopartículas, fornecendo uma medida exata da toxicidade destes nanossistemas (TOLEDO et al., 2019). Os nematódeos adultos possuem quatro sistemas de órgãos (digestivo, reprodutivo, imunológico e neuronal) iguais aos dos vertebrados, isso permite que as análises realizadas neste modelo sejam confiáveis (WU et al., 2019). Os *C. elegans* também apresentam a capacidade de fornecer informações de toxicidade em tempo real, a nível subcelular, molecular e de todo o organismo, simultaneamente. Este modelo tem auxiliado os pesquisadores em suas conclusões de biossegurança para nanomateriais (ZHOU et al., 2015).

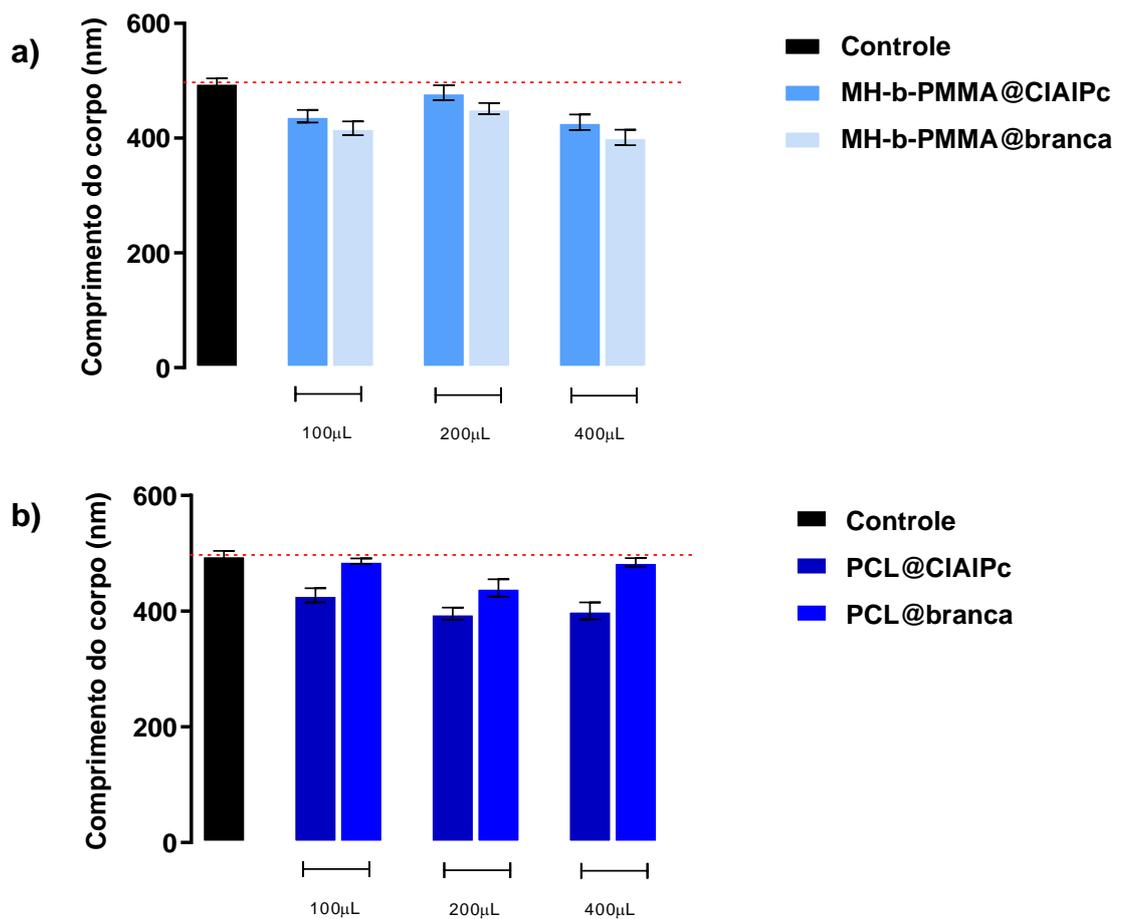
Neste trabalho avaliou-se a toxicidade dos nanocarreadores frente aos nematódeos e sua influência no desenvolvimento larval. Como mostrado na Figura 22, a utilização de até 200 μ L da MH-*b*-PMMA@CIAIPc ou da sua nanopartícula em branco, não levou à letalidade dos animais em comparação ao grupo de controle. Entretanto, quando empregados 400 μ L, notou-se uma redução significativa na sobrevivência dos vermes ($p < 0,01$) em relação ao grupo controle, diminuindo a viabilidade celular em 12,2% e 11,7% para a MH-*b*-PMMA@CIAIPc e MH-*b*-PMMA@branca, respectivamente. Baseado nesses resultados, pode-se assumir que as micelas poliméricas apresentaram uma toxicidade dependente da concentração. Em contraste, as nanopartículas de PCL@CIAIPc, PCL@branca, NE@CIAIPc and NE@branca não induziram a letalidade dos nematódeos. Além disso, o fotossensibilizador apresenta pouca influência na toxicidade frente aos nematódeos, uma vez que não houve diferença significativa entre a CIAIPc carregada e as nanopartículas em branco ($p < 0,05$).

Figura 22 – Taxa de sobrevivência de vermes N2 expostos durante 1h à diferentes volumes das nanopartículas (a) MH-*b*-PMMA@CIAIPc e MH-*b*-PMMA@branca, (b) PCL@CIAIPc e PCL@branca, e (c) NE@CIAIPc e NE@branca. ** (p < 0,01).



Os ensaios de desenvolvimento larval foram realizados para confirmar a segurança dos nanocarreadores. Como observado na Figura 23, todas as nanopartículas causaram uma redução no tamanho do corpo dos animais. Vale destacar que a nanopartícula PCL@CIAIPc apresentou maior redução no desenvolvimento larval, causando uma diminuição de até 20,3% no corpo dos nematódeos. A imagem representativa dos nematódeos expostos às nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc e MH-*b*-PMMA@branca está apresentada na Figura 24. No Apêndice D se encontram as imagens dos nematódeos expostos às demais nanopartículas.

Figura 23 – Comprimento dos animais após 48h de exposição às nanopartículas (a) MH-*b*-PMMA@CIAIPc e MH-*b*-PMMA@branca, (b) PCL@CIAIPc e PCL@branca, e (c) NE@CIAIPc e NE@branca.



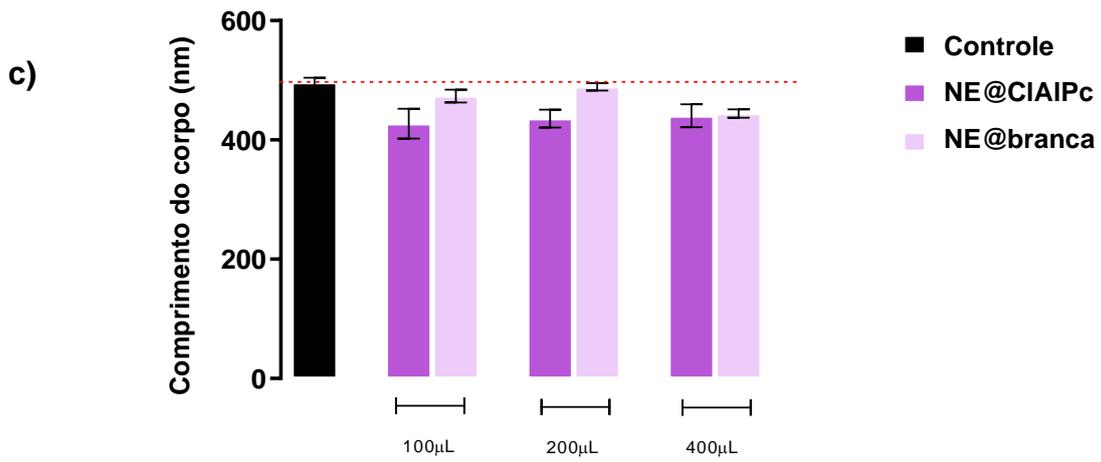
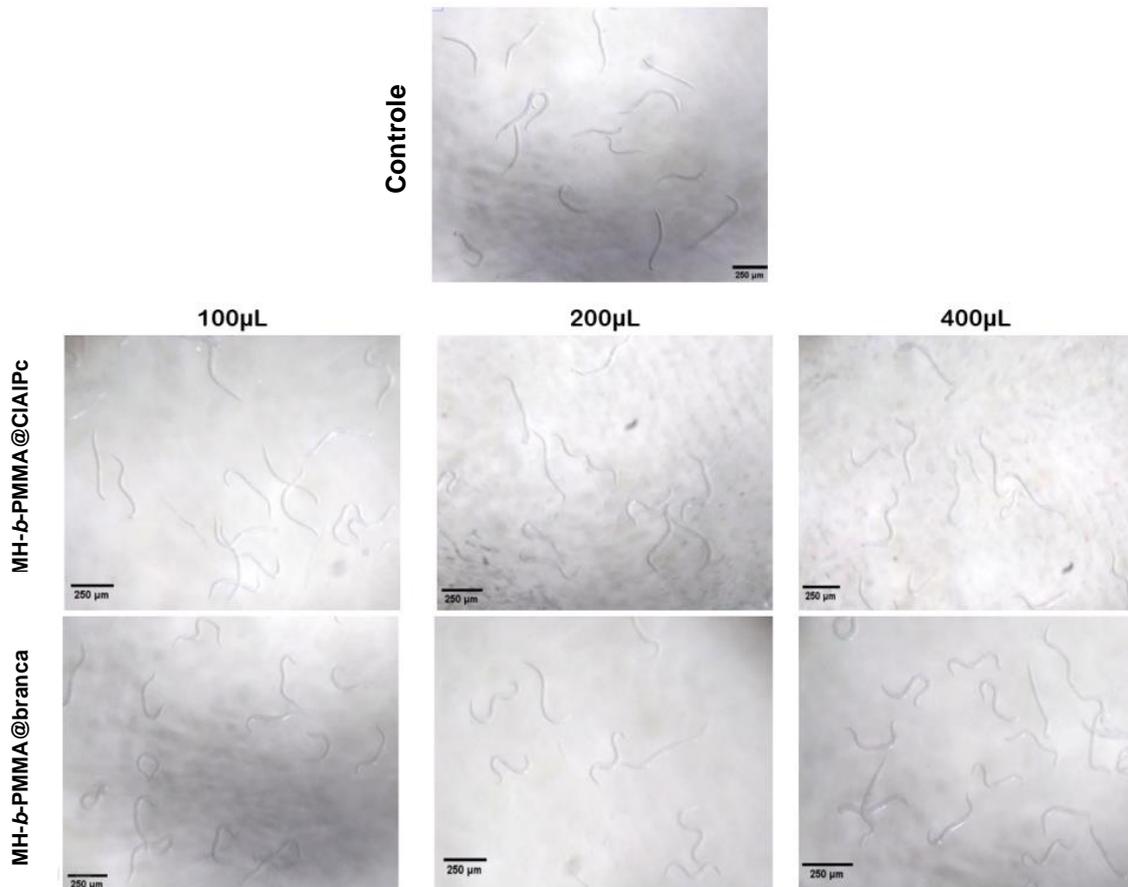
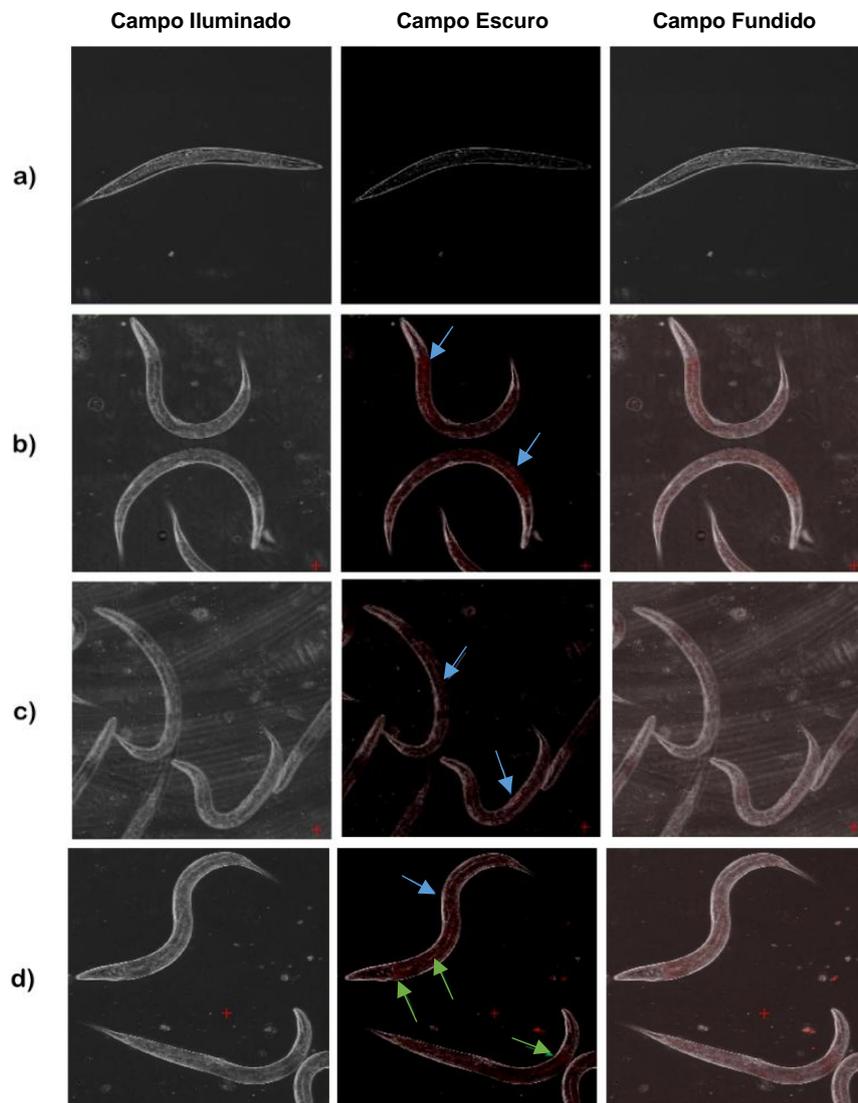


Figura 24 – Imagens representativas do comprimento dos nematódeos após 48h de exposição às nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc e MH-*b*-PMMA@branca.



Nas análises de rastreamento pôde-se observar que os vermes expostos a todos os sistemas nanoestruturados apresentaram fluorescência vermelha, principalmente nas células ao redor do intestino (ver setas azuis na Figura 25) e em menor quantidade no bulbo faríngeo e no lúmen intestinal (ver setas verdes na Figura 25), indicando que a absorção das nanopartículas se deu por via oral. Os resultados obtidos corroboram com estudos anteriores relatados na literatura, onde nanopartículas de quitosana@dsRNA foram encontradas na faringe e no intestino dos nematódeos (LICHTENBERG et al., 2019). Vankoten e colaboradores (2021) confirmaram a distribuição de dendrímeros funcionalizados de β 1-4-fucose no trato digestivo, principalmente na faringe e no intestino dos *C. elegans*. Além disso, Velasques e colaboradores (2018) localizaram no intestino dos nematódeos nanopartículas de PCL contendo curcumina e quinina. Os autores observaram também que as nanopartículas migraram do intestino para outros tecidos após 24 h de tratamento. Estas descobertas mostraram que os sistemas nanoestruturados foram absorvidos e distribuídos nos vermes, demonstrando a importância da nanoencapsulação de fármacos hidrofóbicos.

Figura 25 – Biodistribuição das nanopartículas nos vermes N2 expostos a (a) controle (b) PCL@CIAIPc (c) MH-*b*-PMMA@CIAIPc e (d) NE@CIAIPc.



6 CONCLUSÕES

Este trabalho propôs investigar a nanoencapsulação do fotosensibilizador CIAIPc em três sistemas nanoestruturados: Micelas poliméricas constituídas pelo copolímero em bloco MH-*b*-PMMA; Nanocápsulas de PCL; e Nanoemulsões de tensoativos comerciais Span 60[®] e Tween 80[®]. Através dos resultados obtidos nas análises pode-se afirmar que foram obtidas com êxito três formulações termodinamicamente estáveis.

As nanopartículas apresentaram características físico-químicas condizentes com as expectativas, todas apresentaram tamanho nanométrico e baixos índices de polidispersão, indicando uma excelente homogeneidade dos sistemas. Além do disto, o sistema MH-*b*-PMMA@CIAIPc apresentou formato esférico e raio hidrodinâmico de 41 nm ($D_h = 92$ nm), o que é considerado uma vantagem para a sua utilização em PDT, devido ao efeito EPR e a melhor absorção celular por nanopartículas menores que 100 nm. Todas as dispersões coloidais apresentaram potencial zeta negativo e valores elevados em módulo, o que confirma uma boa estabilidade dos sistemas nanoestruturados ao longo do tempo. As análises de estabilidade mostraram que a nanopartícula MH-*b*-PMMA@CIAIPc apresenta maior estabilidade ao longo do tempo quando comparada com a PCL@CIAIPc e a NE@CIAIPc, prevendo uma vida útil de prateleira de no mínimo 3 anos. As nanopartículas também apresentaram altos valores de eficiência de encapsulamento, próximos a 100%, indicando que os sistemas formulados são promissores no carreamento de substâncias lipofílicas.

Os estudos de fotodegradação do DPBF comprovaram nossa hipótese de que a CIAIPc encapsulada nos sistemas nanoestruturados é capaz de gerar oxigênio singleto quando irradiada com laser de comprimento de onda na região do vermelho do espectro eletromagnético e dentro da chamada janela fototerapêutica. O valor de Φ_Δ para MH-*b*-PMMA@CIAIPc e PCL@CIAIPc mostraram-se significativos para um potencial uso em terapia fotodinâmica, sendo similares ao valor da CIAIPc livre.

Os estudos da cinética de liberação *in vitro* na mistura DMF/Tampão acetato/ácido acético mostraram que as nanopartículas possuem um perfil de liberação em duas etapas. O modelo matemático biexponencial mostrou que ocorre uma rápida liberação da CIAIPc na fase I, seguida por uma liberação controlada e

sustentada na fase II. Além disso, a porcentagem de liberação de fármaco para a MH-*b*-PMMA@CIAIPc foi maior que para a PCL@CIAIPc, após 24 h de análise. Mesmo não havendo a liberação do fotossensibilizador em tampão PBS/SDS, as nanopartículas foram capazes de gerar oxigênio singlete, indicando que a liberação do fármaco não interfere na atividade fotodinâmica.

Nos ensaios de taxa de sobrevivência e desenvolvimento larval frente aos *C. elegans*, todas as nanopartículas levaram a uma diminuição no comprimento do corpo dos nematódeos. Entretanto, as nanopartículas PCL@CIAIPc e NE@CIAIPc não induziram a letalidade dos animais, apresentando dessa forma uma relativamente baixa toxicidade. A nanopartícula MH-*b*-PMMA@CIAIPc apresentou um decréscimo na viabilidade apenas quando utilizado o volume de 400 µL, indicando que em baixas concentrações, o nanocarreador não apresenta elevada toxicidade. Além disso, as análises de rastreamento mostraram que os sistemas nanoestruturados se localizaram majoritariamente nas células ao redor do intestino, comprovando a absorção por via oral das nanopartículas.

7 PERSPECTIVAS

Como perspectivas para trabalhos futuros podemos citar:

- Avaliar o efeito fotodinâmico das nanopartículas frente a células cancerígenas, como por exemplo, células de Caco-2.

REFERÊNCIAS

- ACKROYD, R. et al. The History of Photodetection and Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 74, n. 5, p. 656, 2001.
- AGUILAR, L. R.; VILCHEZ, M. L.; MILLA SANABRIA, L. N. Targeting glioblastoma stem cells: The first step of photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, n. September, p. 102585, 2021.
- ALMEIDA, J. S. et al. Nanostructured Systems Containing Rutin: In Vitro Antioxidant Activity and Photostability Studies. **Nanoscale Research Letters**, v. 5, n. 10, p. 1603–1610, 2010.
- ANDERSKI, J. et al. Mucus-penetrating nanoparticles: Promising drug delivery systems for the photodynamic therapy of intestinal cancer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 129, p. 1–9, 2018.
- ASEM, H. et al. Development and biodistribution of a theranostic aluminum phthalocyanine nanophotosensitizer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 48–57, 2016.
- BAER, D. R. et al. Surface characterization of nanomaterials and nanoparticles: Important needs and challenging opportunities. **Journal of Vacuum Science & Technology A: Vacuum, Surfaces, and Films**, v. 31, n. 5, p. 050820, 2013.
- BANERJEE, S. M. et al. Photodynamic Therapy in Primary Breast Cancer. **Journal of Clinical Medicine**. v. 9, n. 2, p. 483, 2020.
- BANSAL, M. et al. Conducting polymer hydrogels for electrically responsive drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 328, n. June, p. 192–209, 2020.
- BOSCH, S. et al. Sublethal effects of ionic and nanogold on the nematode *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Toxicology**, v. 2018, 2018.
- BROEKGAARDEN, M. et al. Photodynamic therapy with liposomal zinc phthalocyanine and tirapazamine increases tumor cell death via DNA damage. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 13, n. 2, p. 204–220, 2017.
- CABRAL, Á. S. et al. Combined photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine and doxorubicin nanoemulsions in breast cancer model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 218, n. March, 2021.
- CALDAS, B. S. et al. Drug carrier systems made from self-assembled glyco-nanoparticles of maltoheptaose-b-polyisoprene enhanced the distribution and activity of curcumin against cancer cells. **Journal of Molecular Liquids**, v. 309, p. 113022, 2020.
- CARMELLO, J. C. et al. In vivo photodynamic inactivation of *Candida albicans* using chloro-aluminum phthalocyanine. **Oral Diseases**, v. 22, n. 5, p. 415–422, 2016.

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 SPEC. ISS., p. 1–23, 2005.

CASTILHO-FERNANDES, A. et al. Photodynamic process induced by chloro-aluminum phthalocyanine nanoemulsion in glioblastoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 19, n. May, p. 221–228, 2017.

CAVALCANTE, L. L. R. et al. Conjugate of chitosan nanoparticles with chloroaluminium phthalocyanine: Synthesis, characterization and photoinactivation of *Streptococcus mutans* biofilm. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, n. February, p. 101709, 2020.

CHEN, Y. F. et al. The roles of reactive oxygen species (ROS) and autophagy in the survival and death of leukemia cells. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 112, p. 21–30, 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 et al. Concepts and principles of photodynamic therapy as an alternative antifungal discovery platform. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n. APR, p. 1–16, 2012.

DAI, Y. et al. Nanoparticle design strategies for enhanced anticancer therapy by exploiting the tumour microenvironment. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 12, p. 3830–3852, 2017.

DALVI, S. A.; HANNA, R.; GATTANI, D. R. Utilisation of antimicrobial photodynamic therapy as an adjunctive tool for open flap debridement in the management of chronic periodontitis: A randomized controlled clinical trial. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 25, n. September 2018, p. 440–447, 2019.

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.

DES RIEUX, A. et al. Nanoparticles as potential oral delivery systems of proteins and vaccines: A mechanistic approach. **Journal of Controlled Release**, v. 116, n. 1, p. 1–27, 2006.

DESAI, M. P. et al. **Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: Effect of particle size.** **Pharmaceutical Research**, 1996.

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, p. 100384, 2020.

DURMUŞ, M.; NYOKONG, T. Synthesis, photophysical and photochemical studies of new water-soluble indium(III) phthalocyanines. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 6, n. 6, p. 659–668, 2007.

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.

EKENGWU, I E; UTU, O G. Nanotechnology in Automotive Industry: **The Potential of Graphene**. v. 3, n. 1, p. 31–37, 2019.

ESCOBAR, P. et al. Photodynamic therapy using ultradeformable liposomes loaded with chlorine aluminum phthalocyanine against *L. (V.) braziliensis* experimental models. **Experimental Parasitology**, v. 194, n. April 2016, p. 45–52, 2018.

FELDMAN, D. Polymer chemistry - The basic concepts, PC Hiemenz, Marcel Dekker, New York, 1984, 738 pp. No price given. **Journal of Polymer Science: Polymer Letters Edition**, v. 22, n. 12, p. 673-673, 1984.

FESSI, H. et al. **Rapid Communication Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement** *International Journal of Pharmaceutics*. [s.l: s.n.].

FINSEN, N. R. Remarks on the red-light treatment of small-pox. **The British Medical Journal**, p. 1297-1298, 6 jun. 1903.

FU, C. et al. Efficacy and safety of photodynamic therapy with amino-5-laevulinate nanoemulsion versus methyl-5-aminolaevulinate for actinic keratosis: A meta-analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 27, n. April, p. 408–414, 2019.

GHAZI, M. et al. Evaluation of adding nanosized natural zeolite to photodynamic therapy against *P. gingivalis* biofilm on titanium disks. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, n. March, p. 102519, 2021.

GOBO, N. R. D. S. Estratégias sintéticas para a preparação de novos fotossensibilizantes do tipo Ftalocianinas. p. 173, 2013.

GOMES, A N A T P C et al. Cancer , **Photodynamic Therapy and Porphyrin-Type Derivatives**. v. 90, p. 993–1026, 2018.

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

GRANADA, A. et al. Novel hybrid block copolymer nanocarrier systems to load lipophilic drugs prepared by microphase inversion method. **Journal of Polymer Research**, v. 24, n. 12, p. 226, 2017.

GUERRINI, L.; ALVAREZ-PUEBLA, R. A.; PAZOS-PEREZ, N. Surface modifications of nanoparticles for stability in biological fluids. **Materials**, v. 11, n. 7, p. 1–28, 2018.

GUO, S. et al. Research on the fate of polymeric nanoparticles in the process of the intestinal absorption based on model nanoparticles with various characteristics: size, surface charge and pro-hydrophobics. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 19, n. 1, p. 1–21, 2021.

HERATH, H. M. A. et al. **Synthesis, characterization and photochemistry of 5,10,15, 20-tetrakis(4-N-pentylpyridyl)porphyrins, [(TPePyP)H 2] 4+ and [(TPePyP)Zn II] 4+**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.worldscientific.com>.

HIRAKAWA, K.; ISHIKAWA, T. Phenothiazine dyes photosensitize protein damage through electron transfer and singlet oxygen generation. **Dyes and Pigments**, v. 142, p. 183-188, 2017.

HU, C. 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.

IBARRA, L. E. et al. Understanding the glioblastoma tumor biology to optimize photodynamic therapy: From molecular to cellular events. **Journal of Neuroscience Research**. v. 99, n. 4, p. 1024–1047, 2021.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 188, n. 2-3, p. 200–206, 2007.

JI, T.; KOHANE, D. S. Nanoscale systems for local drug delivery. **Nano Today**, v. 28, p. 100765, 2019.

JIN, C. S.; ZHENG, G. Liposomal nanostructures for photosensitizer delivery. **Lasers in Surgery and Medicine**. v. 43, n. 7, p. 734–748, 2011.

JIN, Y. et al. Nanostructures of an amphiphilic zinc phthalocyanine polymer conjugate for photodynamic therapy of psoriasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 405–409, 2015.

KAMALY, N. et al. Degradable controlled-release polymers and polymeric nanoparticles: Mechanisms of controlling drug release. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 4, p. 2602–2663, 2016.

KHAN, B. A. et al. Basics of pharmaceutical emulsions: A review. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, n. 25, p. 2715–2725, 2011.

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 Research**, v. 30, n. 10, p. 2512–2522, 2013.

LEE, W. et al. Diflubenzuron leads to apoptotic cell death through ROS generation and mitochondrial dysfunction in bovine mammary epithelial cells. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 177, n. June, p. 104893, 2021.

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, X. Y. et al. Electrospayed spherical ethylcellulose nanoparticles for an improved sustained-release profile of anticancer drug. **Cellulose**, v. 24, n. 12, p. 5551–5564, 2017.

LIAO, C. et al. Bimodal photodynamic therapy for treatment of a 91-year-old patient with locally advanced cutaneous basal cell carcinoma and postoperative scar management. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, n. September, p. 102553, 2021.

LICHTENBERG, S. S. et al. Uptake and Bioactivity of Chitosan/Double-Stranded RNA Polyplex Nanoparticles in *Caenorhabditis elegans*. **Environmental Science and Technology**, v. 53, n. 7, p. 3832–3840, 2019.

LIMA, A. L. et al. Polymeric nanocapsules: A review on design and production methods for pharmaceutical purpose. **Methods**, n. May 2021, 2021.

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

LIU, J.; LENG, P.; LIU, Y. Oral drug delivery with nanoparticles into the gastrointestinal mucosa. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 1, p. 86–96, 2021.

LIU, S. et al. Impact of pH, freeze-thaw and thermal sterilization on physicochemical stability of walnut beverage emulsion. **Food Chemistry**, v. 196, p. 475–485, 2016.

LO, P. C. et al. The unique features and promises of phthalocyanines as advanced photosensitisers for photodynamic therapy of cancer. **Chemical Society Reviews**, v. 49, n. 4, p. 1041–1056, 2020.

LOPES, S. C. et al. Topical photodynamic therapy with chloroaluminum phthalocyanine liposomes is as effective as systemic pentavalent antimony in the treatment of experimental cutaneous leishmaniasis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, n. August, p. 210–215, 2019.

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.

LUAN, L. et al. A naphthalocyanine based near-infrared photosensitizer: Synthesis and in vitro photodynamic activities. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, n. 13, p. 3775–3779, 2013.

MD, S. et al. Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1274–1283, 2017.

MFOUO-TYNGA, I. S. et al. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, n. July 2020, p. 102091, 2021.

MIR, H. et al. Signaling interplay between PARP1 and ROS regulates stress-induced cell death and developmental changes in *Dictyostelium discoideum*. **Experimental Cell Research**, v. 397, n. 2, p. 112364, 2020.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. **Polymer-based nanocapsules for drug delivery**. **International Journal of Pharmaceutics** Elsevier B.V., , 29 jan. 2010.

MORGADO, L. F. et al. Photodynamic Therapy treatment of onychomycosis with Aluminium-Phthalocyanine Chloride nanoemulsions: A proof of concept clinical trial. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 266–270, 2017.

MORGULCHIK, N.; KAMALY, N. Meta-analysis of in Vitro Drug-Release Parameters Reveals Predictable and Robust Kinetics for Redox-Responsive Drug-Conjugated Therapeutic Nanogels. **ACS Applied Nano Materials**, v. 4, n. 5, p. 4256–4268, 2021.

MOROZOVA, N. B. et al. Photodiagnosis and photodynamic effects of bacteriochlorin-naphthalimide conjugates on tumor cells and mouse model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 223, n. May, p. 112294, 2021.

MUDDINETI, O. S. et al. Lipid and poly (ethylene glycol)-conjugated bi-functionalized chlorine e6 micelles for NIR-light induced photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 29, n. November 2019, p. 101633, 2020.

NESI-REIS, V. et al. Phototoxic effect of aluminium-chlorine and aluminium-hydroxide phthalocyanines on *Leishmania (l.) amazonensis*. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 21, p. 239–245, 2018.

OBAID, G. et al. Photonanomedicine: A convergence of photodynamic therapy and nanotechnology. **Nanoscale**, v. 8, n. 25, p. 12471–12503, 2016.

OMANOVIC, E. Green Internet of Things and Green Nanotechnology Role **SCIENCE, Food**. n. October 2017, 2019.

OTSUKA, I. et al. Control of 10 nm scale cylinder orientation in self-organized sugar-based block copolymer thin films. **Nanoscale**, v. 5, n. 7, p. 2637–2641, 2013a.

OTSUKA, I. et al. Self-assembly of maltoheptaose-block-polystyrene into micellar nanoparticles and encapsulation of gold nanoparticles. **Langmuir**, v. 29, n. 49, p. 15224–15230, 2013b.

PARK, H. E. H.; JUNG, Y.; LEE, S. J. V. Survival assays using *Caenorhabditis elegans*. **Molecules and Cells**, v. 40, n. 2, p. 90–99, 2017.

PLAETZER, K. et al. Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. **Lasers in Medical Science**, v. 24, n. 2, p. 259–268, 2009.

PORTA-DE-LA-RIVA, M. et al. Basic *Caenorhabditis elegans* methods: Synchronization and observation. **Journal of Visualized Experiments**, n. 64, p. 1–9, 2012.

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

PRATAVIEIRA, S. et al. Photodynamic therapy with a new bacteriochlorin derivative: Characterization and in vitro studies. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, n. December 2020, p. 1–8, 2021.

PY-DANIEL, K. R. et al. Highly efficient photodynamic therapy colloidal system based on chloroaluminum phthalocyanine/pluronic micelles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 103, p. 23–31, 2016.

RAK, J. et al. Drug delivery systems for phthalocyanines for photodynamic therapy. **Anticancer research**, v. 39, n. 7, p. 3323-3339, 2019.

RIBEIRO, A. P. D. et al. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloro-aluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions. **Lasers Med Sci**. v. 30, p. 549 - 559, 2015.

RODRIGUES, G. B. et al. Photodynamic inactivation of *Candida albicans* and *Candida tropicalis* with aluminum phthalocyanine chloride nanoemulsion. **Fungal Biology**, v. 124, n. 5, p. 297–303, 2020a.

RODRIGUES, M. C. et al. Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, n. January, p. 111808, 2020b.

ROGER, E. et al. Biopharmaceutical parameters to consider in order to alter the fate of nanocarriers after oral delivery. **Nanomedicine**, v. 5, n. 2, p. 287–306, 2010.

SANTOS, A. C. et al. Nanotechnology-based formulations for resveratrol delivery: Effects on resveratrol in vivo bioavailability and bioactivity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 180, n. December 2018, p. 127–140, 2019.

SANTOS, K. L. M. et al. Prospective application of phthalocyanines in the photodynamic therapy against microorganisms and tumor cells: A mini-review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 32, n. September, 2020.

SCHUENCK-RODRIGUES, R. A. et al. Development, characterization and photobiological activity of nanoemulsion containing zinc phthalocyanine for oral infections treatment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 211, n. August, p. 112010, 2020.

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.

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, n. December 2020, p. 112101, 2021.

SINGH, P. et al. Polymeric microneedles for controlled transdermal drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 315, p. 97–113, 2019.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Pharmazie**, v. 65, n. 1, p. 9–14, 2010.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, v. 33, n. 3, p. 1744–1752, 2013.

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.

SONG, B. H. et al. Photodynamic therapy using chlorophyll-a in the treatment of acne vulgaris: A randomized, single-blind, split-face study. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 71, n. 4, p. 764–771, 2014.

SPESIA, M. B.; MILANESIO, M. E.; DURANTINI, E. N. Synthesis, properties and photodynamic inactivation of Escherichia coli by novel cationic fullerene C60 derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 43, n. 4, p. 853–861, 2008.

SZTANDERA, K. et al. PAM. **Pharmaceutical Research**, v. 36, n. 10, 2019.

TEDESCO, A. C. et al. Cholesterol-rich nanoemulsion (LDE) as a novel drug delivery system to diagnose, delineate, and treat human glioblastoma. **Materials Science and Engineering C**, v. 123, n. April 2020, p. 111984, 2021.

TEMIZEL, E. et al. Delivery of lipophilic porphyrin by liposome vehicles: Preparation and photodynamic therapy activity against cancer cell lines. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 11, n. 4, p. 537–545, 2014.

- TISOCO, I. et al. Photophysical, photooxidation, and biomolecule-interaction of meso-tetra(thienyl)porphyrins containing peripheral Pt(ii) and Pd(ii) complexes. Insights for photodynamic therapy applications. **Dalton Transactions**, v. 51, n. 4, p. 1646–1657, 2022.
- 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.
- UNANYAN, A. et al. Efficacy of photodynamic therapy in women with HSIL, LSIL and early stage squamous cervical cancer: a systematic review and meta-analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 36, n. September, p. 102530, 2021.
- VANKOTEN, H. W.; MOORE, R. S.; CLONINGER, M. J. Nanoparticles to Study Lectins in *Caenorhabditis elegans*: Multivalent Galactose β 1-4 Fucose-Functionalized Dendrimers Provide Protection from Oxidative Stress. **Biomacromolecules**, v. 22, n. 11, p. 4720–4729, 2021.
- 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, n. November 2017, p. 1–12, 2018.
- VILLETTI, M. A. et al. Design and Characterization of Maltoheptaose- b -Polystyrene Nanoparticles , as a Potential New Nanocarrier for Oral Delivery of Tamoxifen. 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.
- WANG, Y. et al. Chitosan/hyaluronan nanogels co-delivering methotrexate and 5-aminolevulinic acid: A combined chemo-photodynamic therapy for psoriasis. **Carbohydrate Polymers**, v. 277, n. July 2021, 2022.
- WU, T. et al. *Caenorhabditis elegans* as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles. **Chemosphere**, v. 221, p. 708–726, 2019.
- XU, S. et al. Highly efficient photosensitizers with aggregation-induced emission characteristics obtained through precise molecular design. **Chemical Communications**, v. 53, n. 62, p. 8727–8730, 2017.
- ZENG, K. et al. GLUT1/3/4 as novel biomarkers for the prognosis of human breast cancer. **Translational Cancer Research**, v. 9, n. 4, p. 2363–2377, 2020.
- ZEPON, K. M. et al. Glyco-nanoparticles made from self-assembly of maltoheptaose-block -poly(methyl methacrylate): Micelle, reverse micelle, and encapsulation. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 7, 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, n. 18, p. 4538–4545, 2016.

ZHANG, X. QIAN, J.; PAN, B.. Fabrication of Novel Magnetic Nanoparticles of Multifunctionality for Water Decontamination. **Environmental Science and Technology**. v. 50, n. 2, p. 881–889, 2016.

ZHANG, J. et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**.v. 8, n. 2, p. 137–146, 2018.

ZHANG, L. et al. Conventional versus daylight photodynamic therapy for acne vulgaris: A randomized and prospective clinical study in China. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, n. March, p. 101796, 2020.

ZHAO, W. et al. Nanoscale manipulation of membrane curvature for probing endocytosis in live cells. **Nature Nanotechnology**. v. 12, n. 8, p. 750–756, 2017.

ZHAO, Y. et al. Antimicrobial photodynamic therapy versus antibiotics as an adjunct in the treatment of periodontitis and peri-implantitis: A systematic review and meta-analysis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, n. January, p. 102231, 2021.

ZHONG, Y. et al. Hierarchical dual-responsive cleavable nanosystem for synergetic photodynamic/photothermal therapy against melanoma. **Materials Science and Engineering C**, v. 131, n. July, 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.

ZHU, H. et al. Recent progress in the development of near-infrared organic photothermal and photodynamic nanotherapeutics. **Biomaterials Science**, v. 6, n. 4, p. 746–765, 2018.

ZHUANG, J. et al. Efficient photosensitizers with aggregation-induced emission characteristics for lysosome- And Gram-positive bacteria-targeted photodynamic therapy. **Chemical Communications**, v. 56, n. 17, p. 2630–2633, 2020.

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

Figura A1 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para MH-*b*-PMMA@CIAIPc.

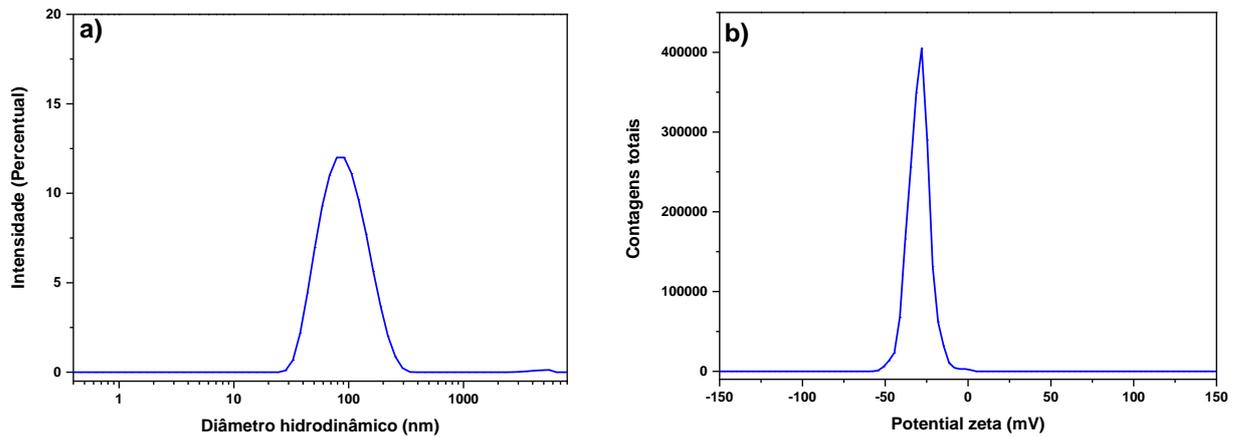


Figura A2 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para PCL@CIAIPc.

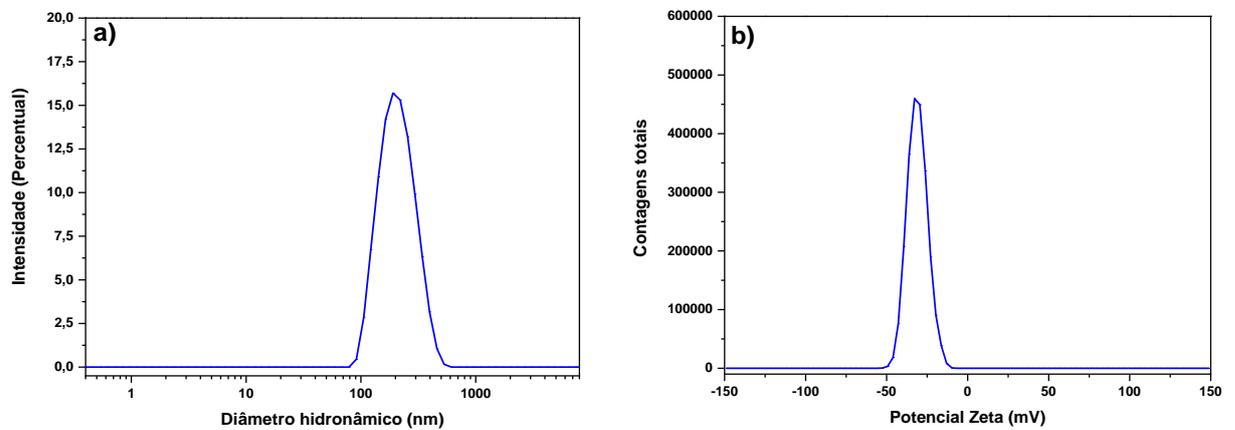


Figura A3 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para NE@CIAIPc.

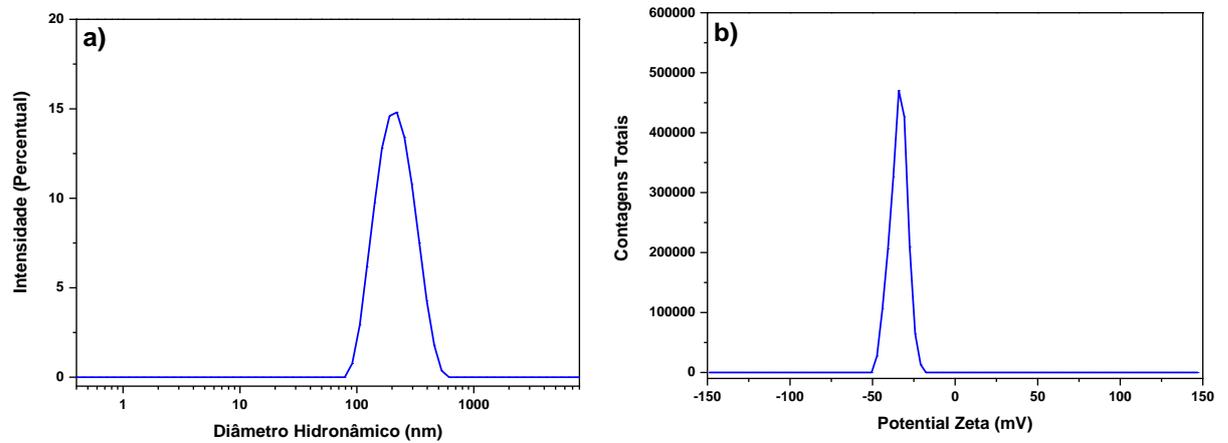


Figura A4 – (a) Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para MH-*b*-PMMA@branca.

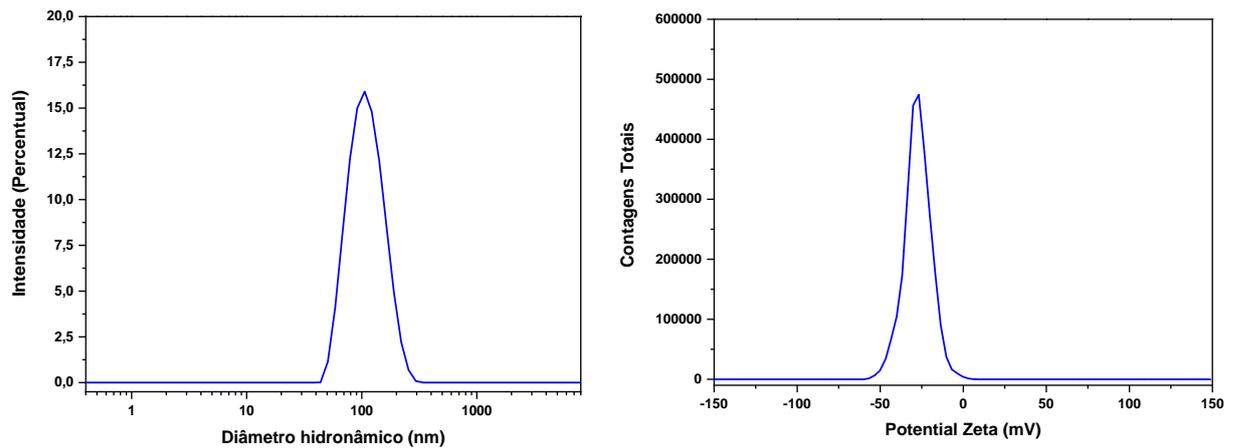


Figura A5 – Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para PCL@branca.

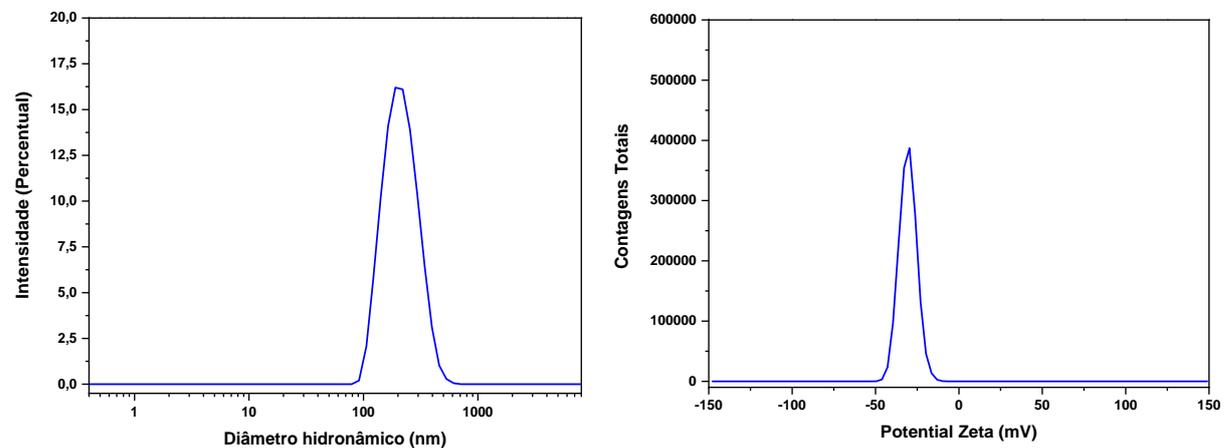
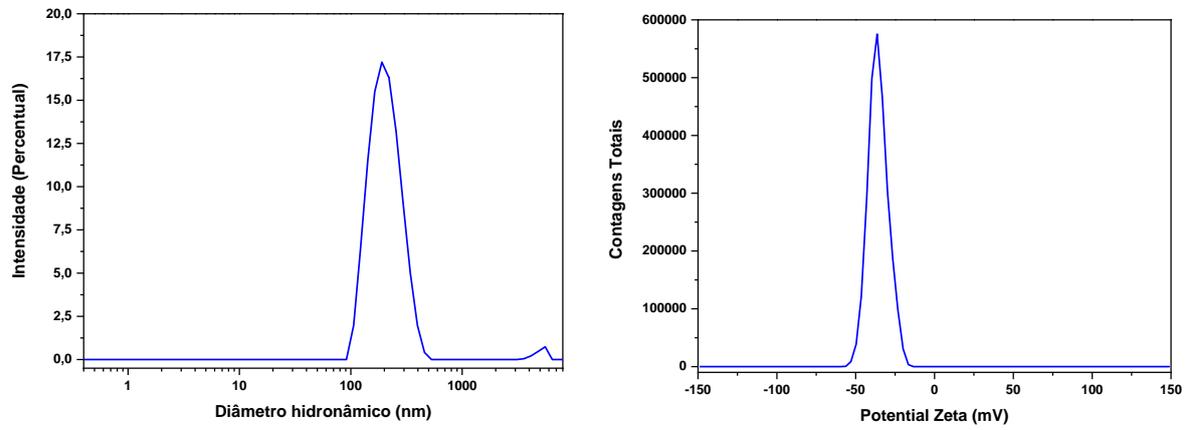


Figura A6 – Intensidade de luz espalhada $I(q)$ versus diâmetro hidrodinâmico; (b) Contagens totais versus o potencial zeta para NE@branca.



APÊNDICE B – CURVA DE CALIBRAÇÃO E TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE FÁRMACO TOTAL E FÁRMACO LIVRE

Figura B1 – Curva de calibração da CIAIPc em DMF. Intensidade *versus* comprimento de onda.

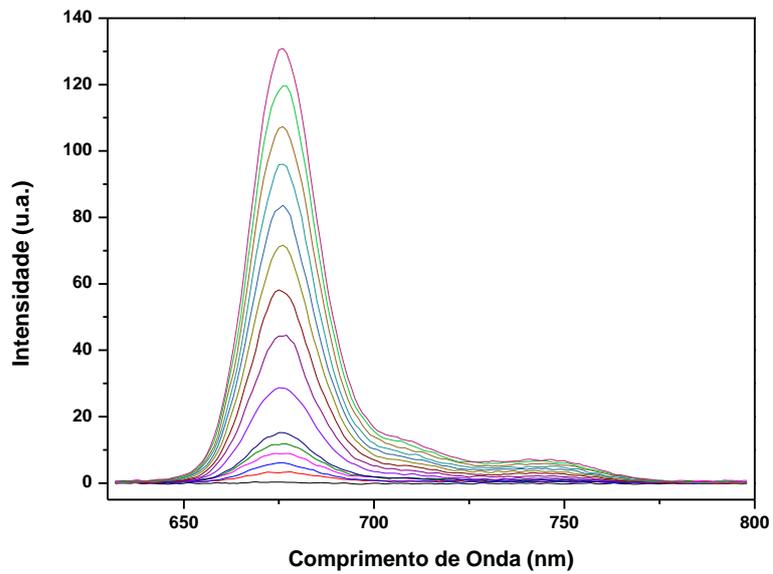


Figura B2 – Curva de calibração da CIAIPc em DMF. Intensidade *versus* concentração da CIAIPc. (Realizada em triplicata).

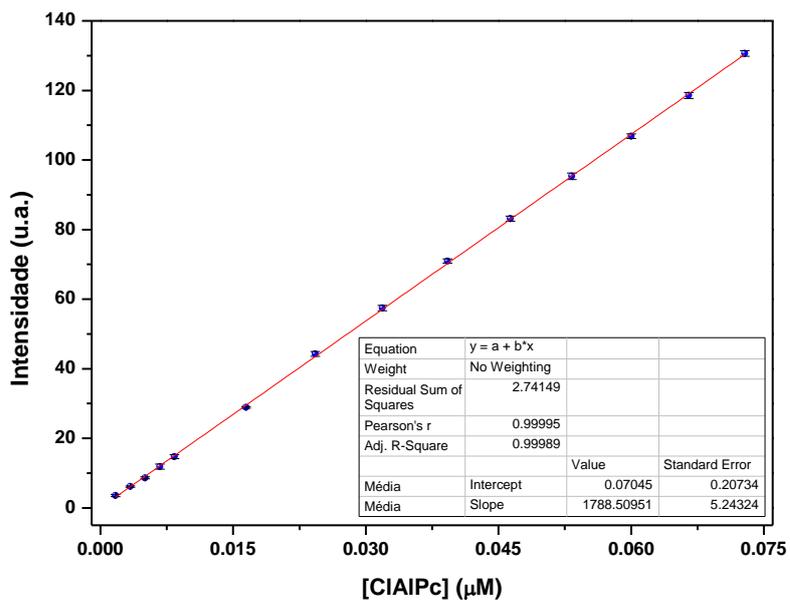


Figura B3 – Intensidade *versus* comprimento de onda, para as análises realizadas em triplicata de **a)** conteúdo de fotossensibilizador e **b)** teor de CIAIPc livre, para as nanopartículas MH-*b*-PMMA@CIAIPc.

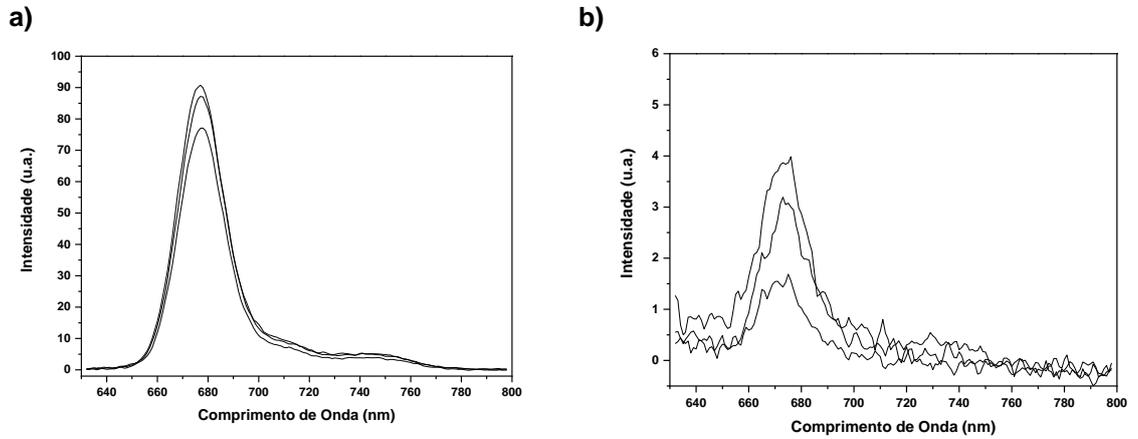


Figura B4 – Intensidade *versus* comprimento de onda, para as análises realizadas em triplicatas de **a)** conteúdo de fotossensibilizador e **b)** teor de CIAIPc livre, para as nanopartículas PCL@CIAIPc.

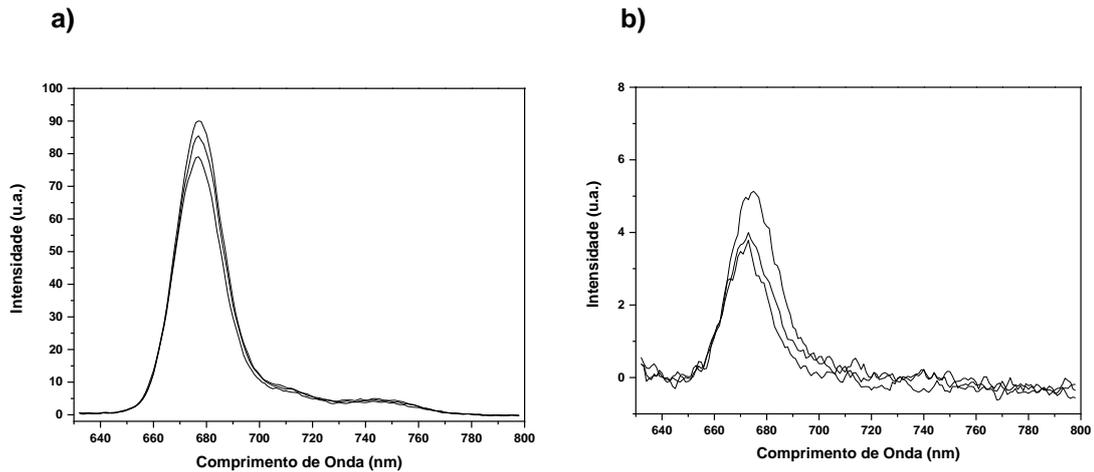
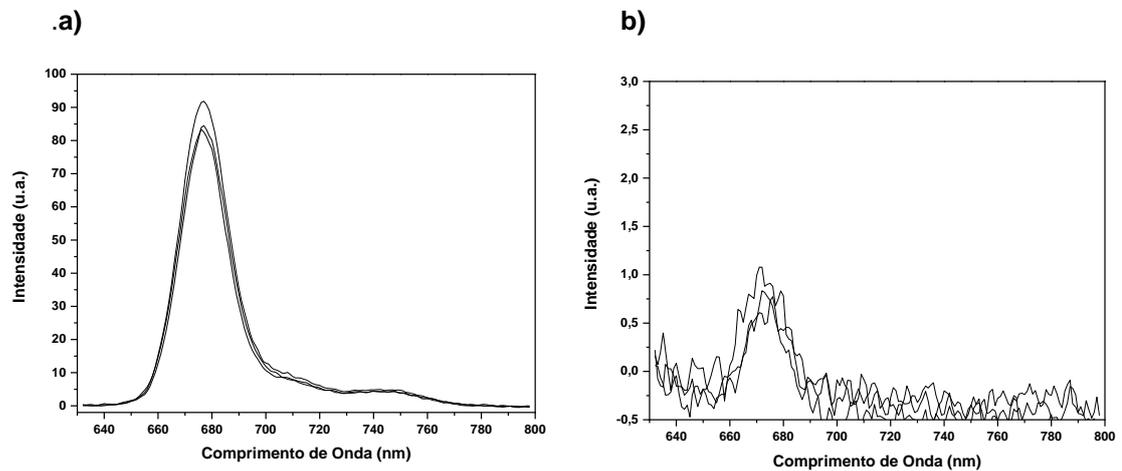


Figura B5 – Intensidade *versus* comprimento de onda, para as análises realizadas em triplicatas de **a)** conteúdo de fotossensibilizador e **b)** teor de CIAIPc livre, para as nanopartículas NE@CIAIPc.



APÊNDICE C – TRIPLICATA DAS ANÁLISES DE FOTODEGRADAÇÃO DO DPBF

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

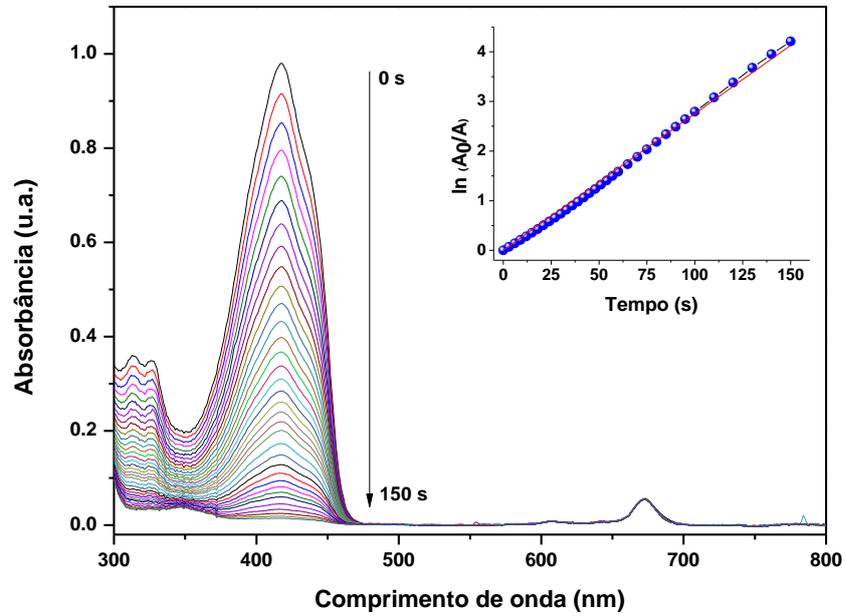


Figura C2 – Fotodegradação do DPBF na presença da ZnPc livre (duplicata).

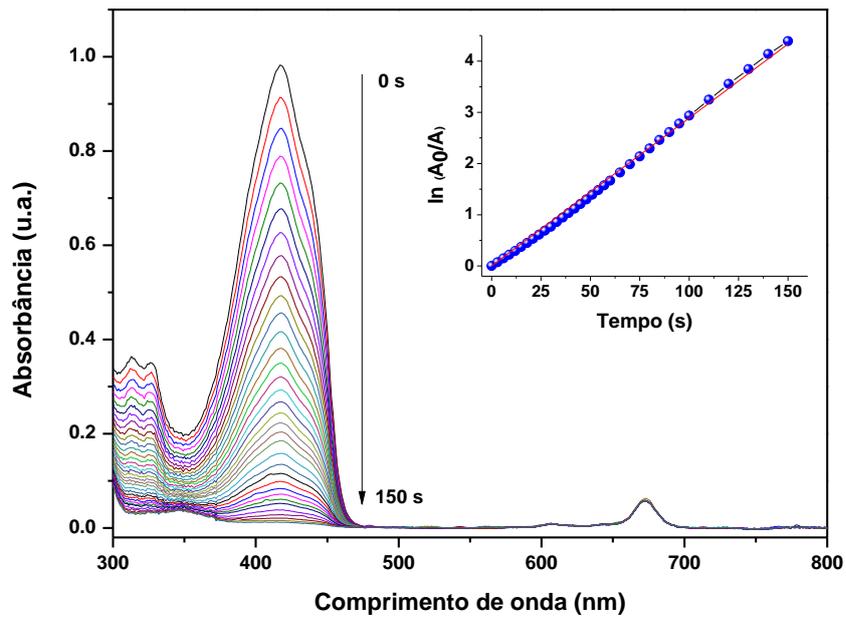


Figura C3 – Fotodegradação do DPBF na presença da ZnPc livre (triplicata).

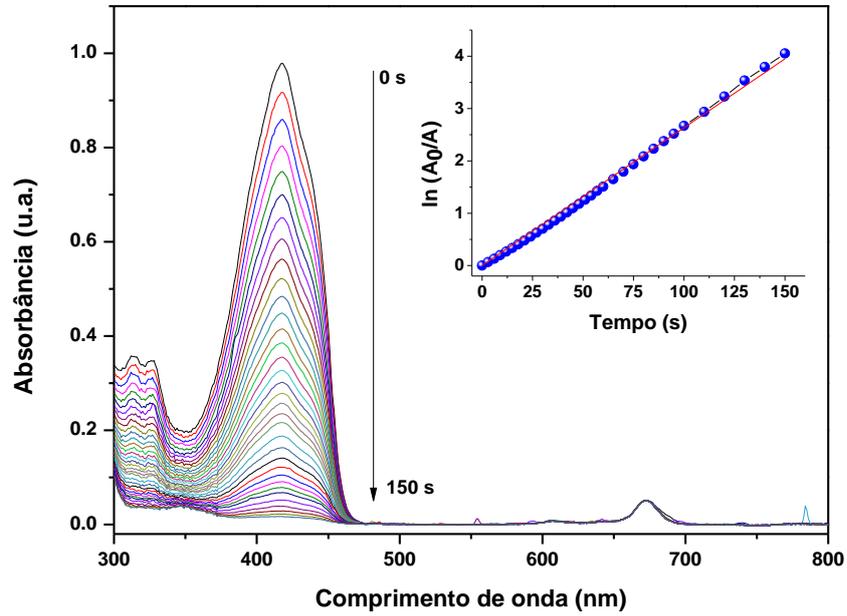


Figura C4 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da ZnPc livre (triplicata).

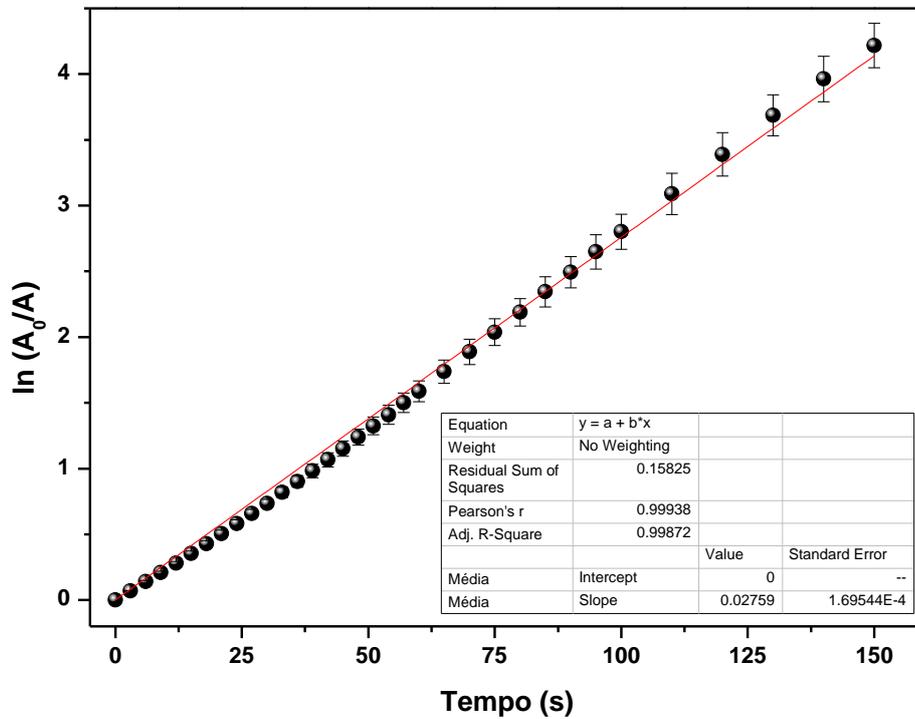


Figura C5 – Fotodegradação do DPBF na presença da CIAIPc livre (duplicata).

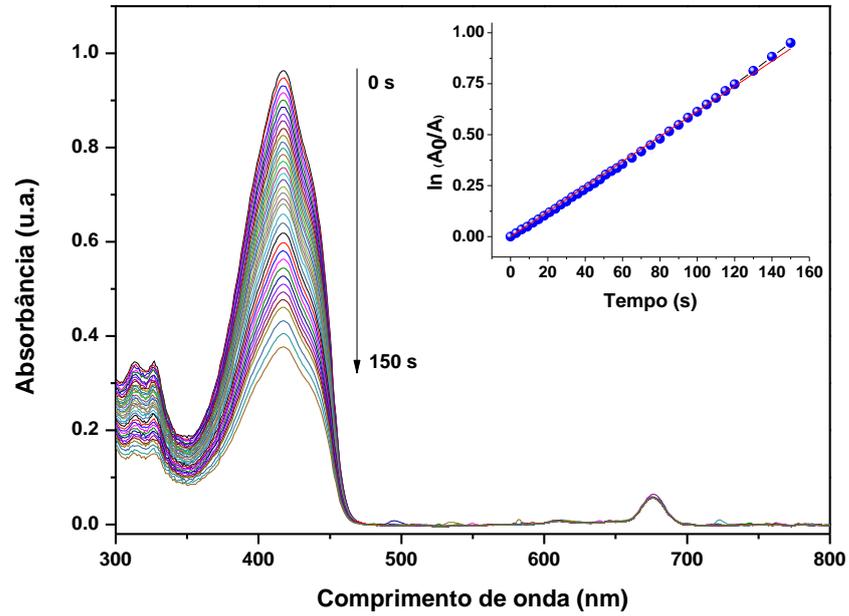


Figura C6 – Fotodegradação do DPBF na presença da CIAIPc livre (triplicata).

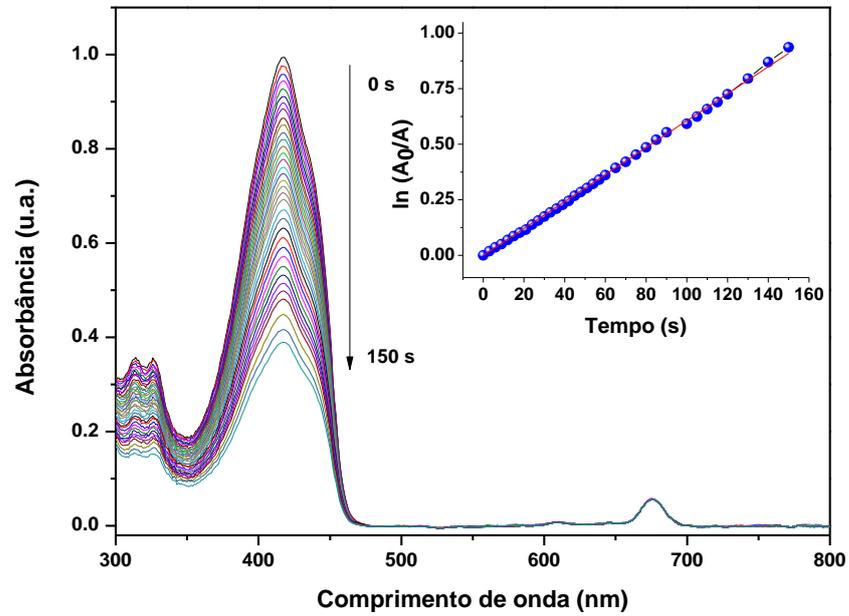


Figura C7 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da CIAIPc livre (triplicata).

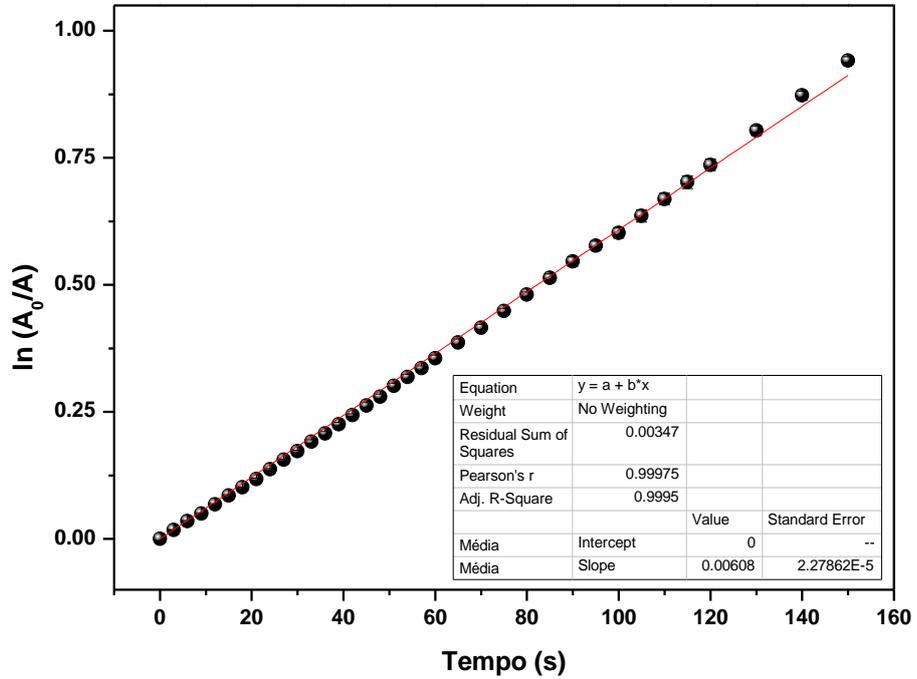


Figura C8 – Fotodegradação do DPBF na presença da MH-*b*-PMMA@CIAIPc (duplicata).

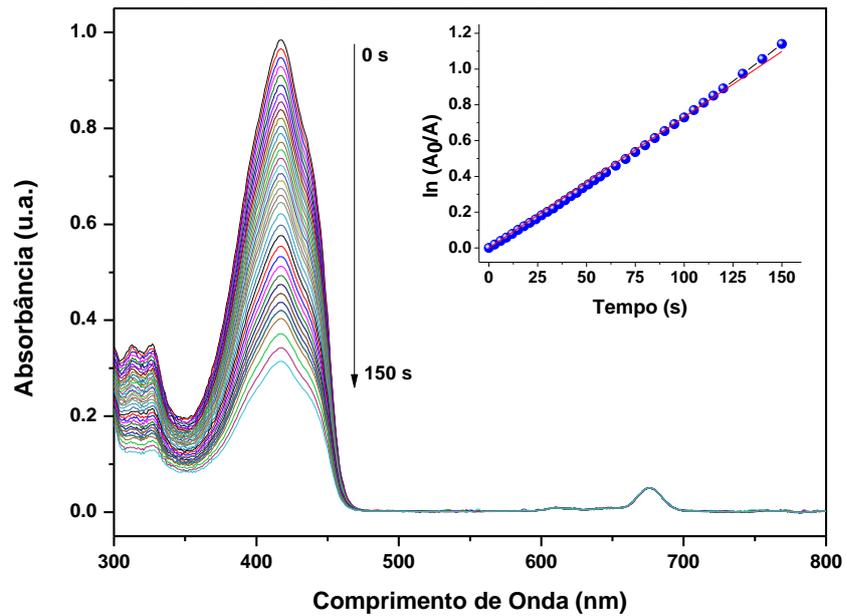


Figura C9 – Fotodegradação do DPBF na presença da MH-*b*-PMMA@CIAIPc (triplicata).

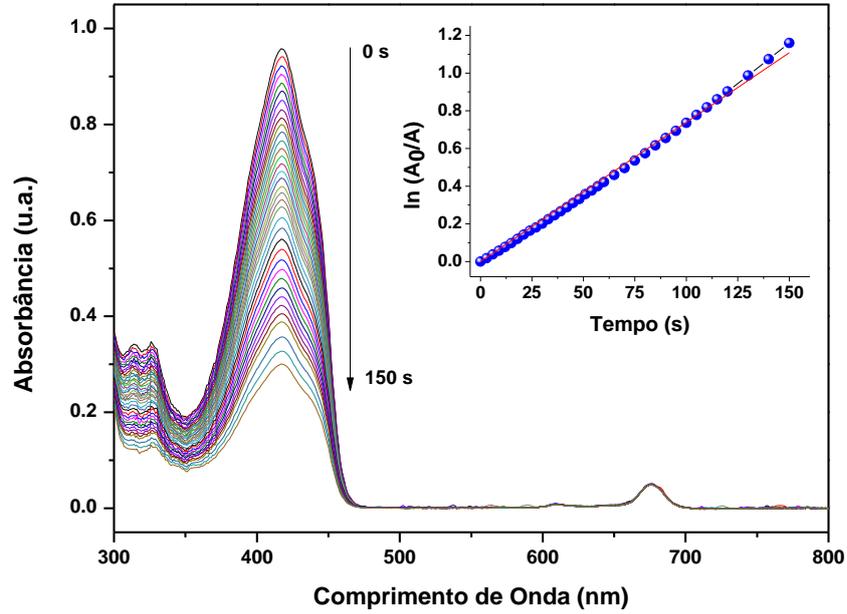


Figura C10 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da MH-*b*-PMMA@CIAIPc (triplicata).

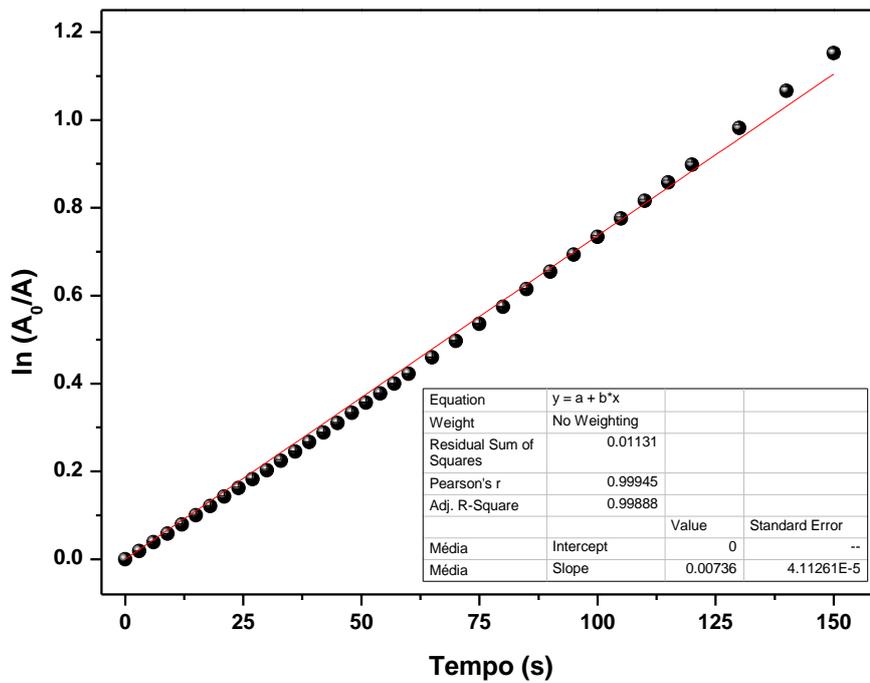


Figura C11 – Fotodegradação do DPBF na presença da PCL@CIAIPc (duplicata).

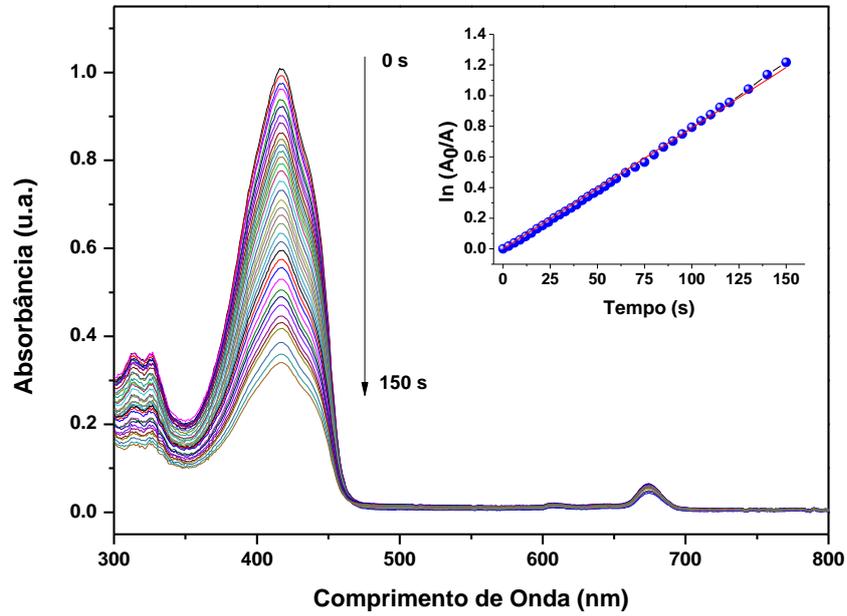


Figura C12 – Fotodegradação do DPBF na presença da PCL@CIAIPc (triplicata).

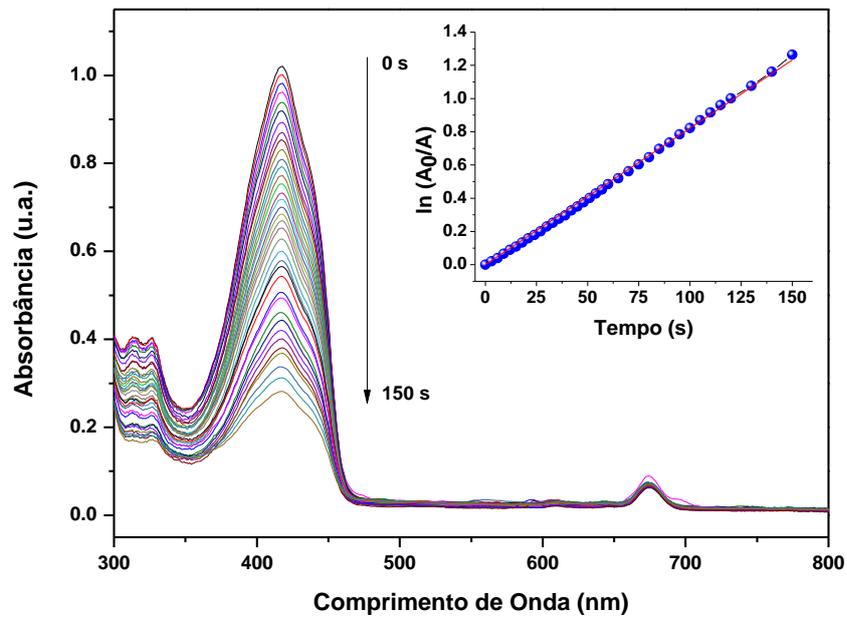


Figura C13 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da PCL@CIAIPc (triplicata).

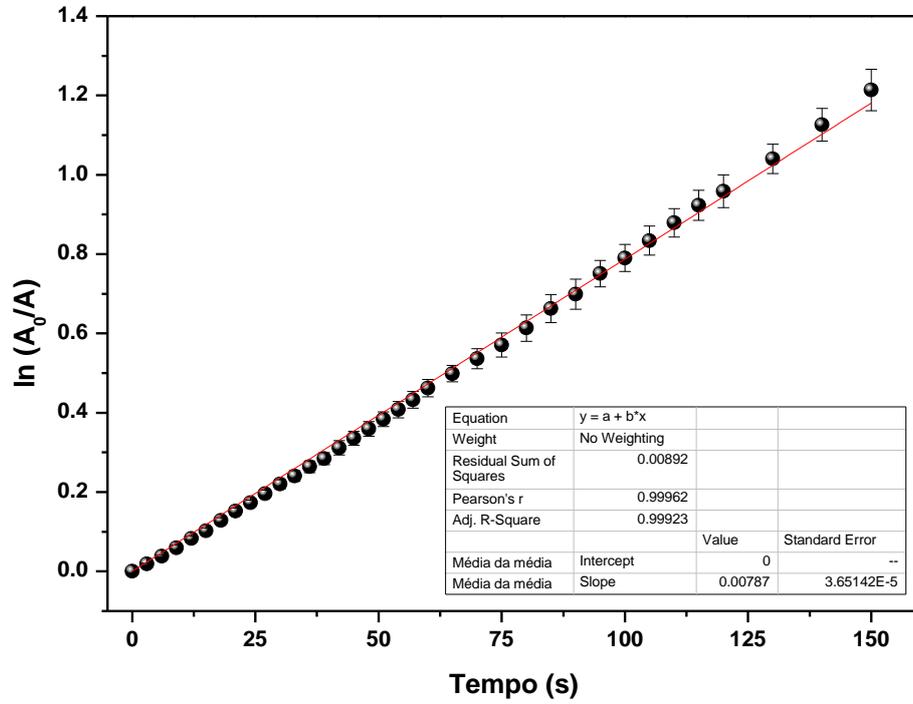


Figura C14 – Fotodegradação do DPBF na presença da NE@CIAIPc (duplicata).

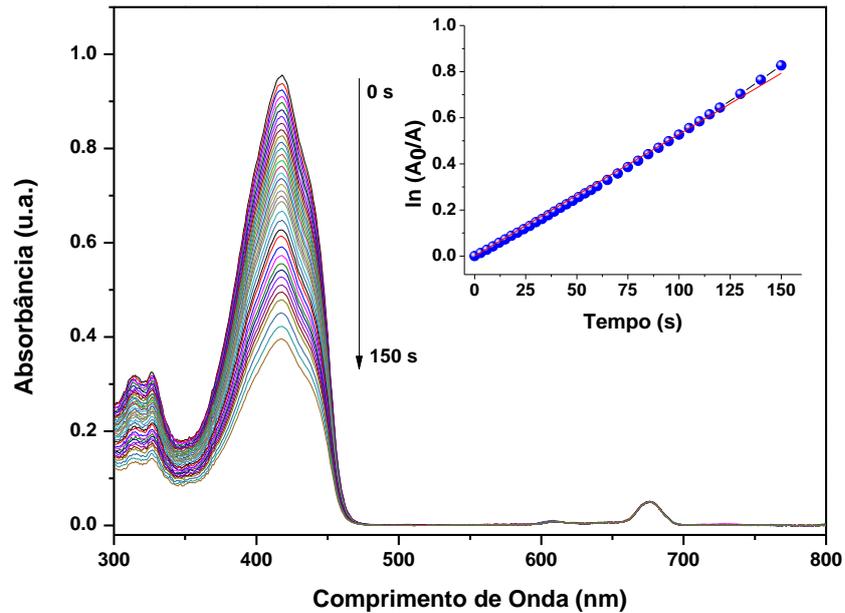


Figura C15 – Fotodegradação do DPBF na presença da NE@CIAIPc (triplicata).

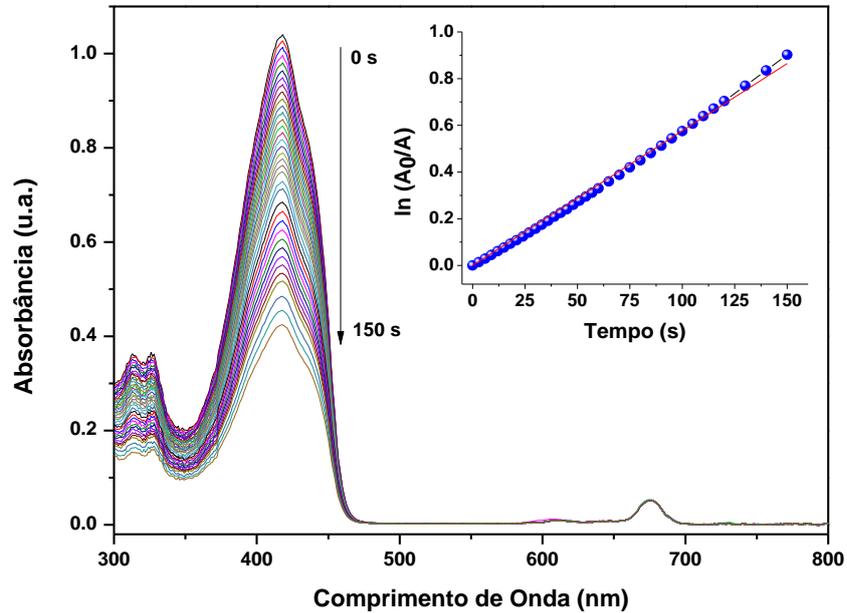
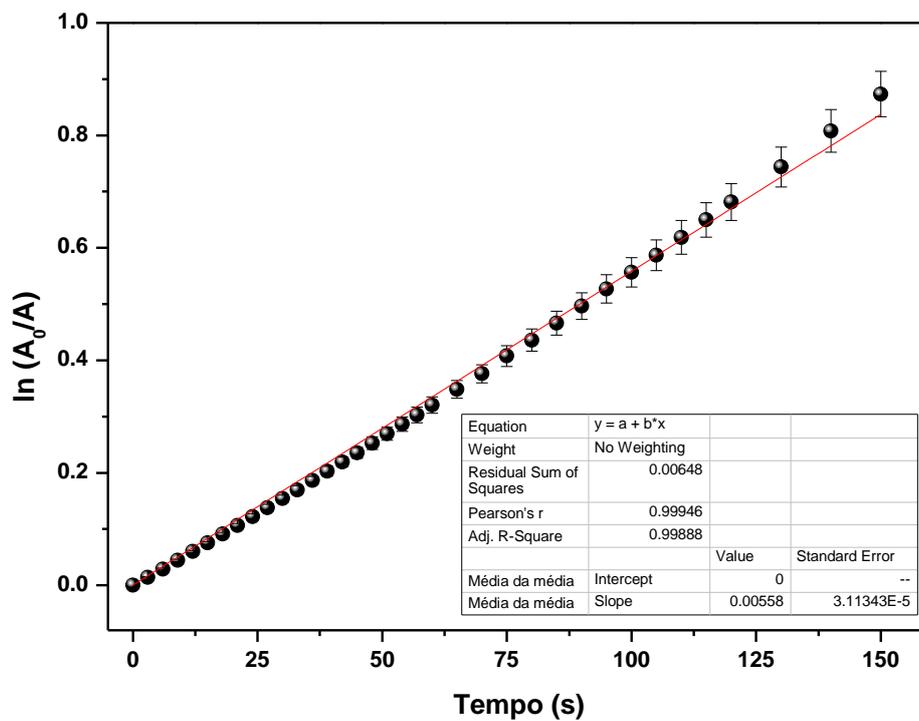


Figura C16 – Gráfico de $\ln(A_0/A)$ versus tempo da cinética de fotodegradação do DPBF na presença da NE@CIAIPc (triplicata).



APÊNDICE D – IMAGENS REPRESENTATIVAS DOS NEMATÓDEOS EXPOSTOS ÀS NANOPARTÍCULAS

Figura D1 – Imagens representativas do comprimento dos nematódeos após 48h de exposição às nanopartículas PCL@CIAIPc, PCL@branca, NE@CIAIPc e NE@branca.

