



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Câmpus de Araraquara

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas



“Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de Fenil-tio-ftalocianinica de Zinco e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana”

Rodrigo Passos Evangelista

Orientador: Prof. Dr Fernando Lucas Primo

Araraquara – SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Campus de Araraquara
Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas

“Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de Fenil-tio-ftalocianina de Zinco e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana”

Rodrigo Passos Evangelista

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr Fernando Lucas Primo

Araraquara – SP
2019

E92d Evangelista, Rodrigo Passos.
Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de Fenil-tio-ftalocianina de Zinco e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana / Rodrigo Passos Evangelista. – Araraquara: [S.n.], 2019.
88 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

1. Nanocápsulas. 2. Fenil-tio-ftalocianina. 3. Anfotericina B. 4. Espectroscopia. 5. Microscopia de Força Atômica. 6. Citotoxicidade. 7. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.




CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

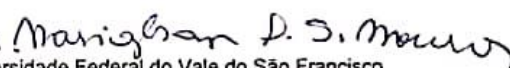
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de derivado ftalocianínico e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana

AUTOR: RODRIGO PASSOS EVANGELISTA

ORIENTADOR: FERNANDO LUCAS PRIMO

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de conhecimento: Sem Área de Conhecimento pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO
Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP - Araraquara

Prof. Dr. MARIGILSON PONTES DE SIQUEIRA MOURA 
Colegiado Acadêmico de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal do Vale do São Francisco

Prof. Dr. RODRIGO FERNANDO COSTA MARQUES 
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara

Araraquara, 04 de dezembro de 2019

AGRADECIMENTOS

Permito-me iniciar revelando que com relação a esse trabalho desenvolvido, pessoas há cuja minha gratidão é enorme e, possivelmente, as palavras sejam ineficientes em expressar tal sentimento, pois apenas funcionam como a letra de uma bela música sem com isso poder transmitir a sua melodia que toca e encanta.

Meus Sinceros votos de agradecimentos:

À DEUS primeiramente, pois ele me deu a maior de todas as oportunidades, a VIDA, a partir da qual tudo se inicia tornando possíveis às realizações permeadas por ações, sensações e emoções, culminando em experiências de superação.

Ao meu Orientador e Prof. Dr. Fernando Lucas Primo que me aceitara como aluno oportunizando o avanço dos meus estudos e conhecimento. Além disso, sempre foi bastante compreensivo com minhas dificuldades, fossem elas de ordem teórico-práticas ou pessoais, e me deu apoio para continuar em um momento bem difícil por que passei durante o mestrado.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas e a Faculdade de Ciências Farmacêuticas-UNESP de Araraquara (incluindo aqui também todos os professores, técnicos e auxiliares administrativos) que mais uma vez abriu as suas portas para me receber permitindo que eu utilizasse as suas dependências sempre em prol do avanço do conhecimento.

À profa. Dr^a Rosimeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro que, com seu conhecimento, auxiliou no planejamento dos ensaios biológicos cedendo, também, a linhagem fúngica, e ao colega e técnico de laboratório, Rodrigo Sorrechia, pela ajuda, inclusive, na consecução de tais ensaios.

À minha companheira Lídia Harumi Uehara que divide comigo as alegrias e as tristezas de cada dia, incitando-me a tornar-me um Ser Humano cada vez melhor.

Aos colegas de pós-graduação Agnes, Bruno, Cassamo, Daniela, Renata, e, principalmente, à colega Camila Fernanda Amantino que, desde o início de minhas atividades de pós-graduando, foi quem mais me ensinou e ajudou no entendimento da teoria bem como da prática experimental. Doou seu tempo com paciência e, talvez sem perceber, fez não apenas o seu projeto de pesquisa acontecer, mas, certamente, o meu também. Muito obrigado Camila, desejo-lhe paz e um futuro abundante de realizações positivas.

À toda a minha família, sobretudo ao meu tio Valmir Passos que, desde o início da minha vida, me deu as oportunidades de estudar e à minha tia Fátima Derissi Passos, que com seu esforço e auxílio em meus deveres de ordem pessoal, permitiram que eu fosse até o fim neste projeto. Ah, quantas conversas e histórias foram contadas ao pé de uma mesa acompanhadas por uma deliciosa xícara de café.

À CAPES: O presente trabalho foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001.

Enfim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui.

RESUMO

O avanço tecnológico cresce rapidamente no mundo, inclusive na área farmacêutica. Nesse contexto, sistemas nanoestruturados ganham progressivo destaque, porquanto carregam um enorme potencial para o aperfeiçoamento das práticas terapêuticas atuais. A administração de fármacos na forma livre pode apresentar problemas como baixa concentração no sítio ativo, inadequada distribuição pelo organismo, baixa biodisponibilidade, presença de efeitos adversos, entre outros. As nanocápsulas poliméricas são capazes de contornar tais vieses, possibilitando, inclusive, a diminuição da toxicidade com a diminuição de doses e aumento da estabilidade de fármacos em meios biológicos. Foram desenvolvidas nanocápsulas poliméricas contendo Anfotericina B (AMB) e Fenil-tio-ftalocianina de zinco (ZnS₄Pc) na concentração teórica de 0,05 mg.mL⁻¹ objetivando, com a associação entre os dois ativos, melhorar a atividade antifúngica conseguida pelo antifúngico isoladamente utilizando-se a Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana. A avaliação das características físico-químicas das nanocápsulas mostraram diâmetro médio de partícula de 253,8 ± 17,3 nm, índice de polidispersidade médio de 0,36 ± 0,01 e potencial Zeta médio de - 31,03 ± 5,54 mV. Tais análises revelaram-se satisfatórias já que o diâmetro de partícula conseguido pelo método de deposição interfacial de polímero pré-formado utilizado na produção das nanocápsulas varia de 250 a 500 nm (MORA-HUERTAS et. al., 2010), enquanto que o potencial zeta considerado para uma formulação estável deve ser maior que 30 mV em módulo (RAVAL et al., 2019). Análises de espectroscopia de absorção e emissão realizadas na região do UV-Vis não encontraram alterações nas propriedades fotofísicas no estado estacionário de NC/ZnS₄Pc e NC/ZnS₄Pc + AMB em relação a ZnS₄Pc livre. Os ativos nas NC foram quantificados utilizando-se uma curva analítica de correlação de absorção e concentração variando de 0,255 a 2,04 µg.mL⁻¹ para a ZnS₄Pc e 0,50 a 10,00 µg.mL⁻¹ para AMB, de cuja análise obtivemos uma quantificação, para as NC com ativos isolados, de 43,8% para ZnS₄Pc e 75,0% para AMB; Para as NC mistas, isto é, NC/ZnS₄Pc + AMB, esses teores foram de 30,7% e 67,7%, respectivamente. No que diz respeito ao teor de encapsulação, para as nanocápsulas com ativos isolados, notou-se um alto valor de 89,6% para ZnS₄Pc e que se manteve com 89,2% para as NC Mistas. Além disso, um estudo morfológico das formulações de NC foi realizado com Microscopia de Força Atômica denotando a presença de nanocápsulas de formato esférico e com distribuição homogênea. O ensaio de viabilidade celular com as células NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™ não demonstrou citotoxicidade para as mesmas na presença das NC mistas com fatores de diluição de até 15% (v/v). Para o ensaio de atividade fotodinâmica, foram utilizadas NC mistas diluídas de 1% e 5% (v/v) junto às leveduras *Candida albicans* ATCC® 90028 e, diferentemente do que ocorreu para as células NIH/3T3, as NC mistas apresentaram toxicidade fúngica tanto na ausência de luz quanto na presença da mesma com irradiação de 12 J/cm² e 25 J/cm². Todos os resultados foram tratados estatisticamente através do teste de análise de variância One-way ANOVA seguido do pós teste Tukey t-test para múltiplas comparações (p<0,05).

Palavras-chaves: Nanocápsulas. Fenil-tio-ftalocianina. Anfotericina B. Espectroscopia. Microscopia de Força Atômica. Citotoxicidade. Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana.

ABSTRACT

Technological advancement is growing rapidly in the world, including the pharmaceutical area. In this context, nanostructured systems gains progressive prominence, as they carry enormous potential for the improvement of current therapeutic practices. The drugs administration in the free-form may present problems such as low active site concentration, inadequate distribution throughout body, low bioavailability, presence of adverse effects, among others. Polymeric nanocapsules allowing the reduction of toxicity with decreasing doses and increasing the stability of drugs in biologic media. Polymeric nanocapsules containing Amphotericin B (AMB) and zinc phenyl-thio-phthalocyanine (ZnS4Pc) were developed at a 0.05 mg/mL theoretical concentration to improve antifungal activity with the association between the two actives over antifungal alone. The nanocapsules physical-chemical characteristics showed an average particle diameter of $253,8 \pm 17,3$ nm, an average polydispersity index of $0,36 \pm 0,01$ and negative Zeta potential $-31,03 \pm 5,54$ mV. These analyzes proved satisfactory since the particle diameter achieved by the preformed polymer interfacial deposition method used in nanocapsule production ranges from 250 to 500 nm (MORA-HUERTAS et. al., 2010), while the Zeta potential considered for a stable formulation should be bigger than 30 mV in modulus (RAVAL et al., 2019). Absorption and emission spectroscopy analyzes performed in the UV-Vis region found no changes in the steady state photophysical properties of NC / ZnS4Pc and NC / ZnS4Pc + AMB in relation to free form ZnS4Pc. Assay quantification was performed using a concentration and absorption correlation analytical curve ranging from 0.255 to 2.04 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for ZnS4Pc and 0.50 to 10.00 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for AMB. For NC with isolated assets, we got 43.8% for ZnS4Pc and 75.0% for AMB; for the mixed NC (NC / ZnS4Pc + AMB) these contents were 30.7% and 67.7% respectively. Regarding the encapsulation content, for nanocapsules with isolated actives, a high value of 89.6% was observed for ZnS4Pc and remained with 89.2% for Mixed NC. In addition, a morphological study of NC formulations was performed with Atomic Force Microscopy denoting the presence of homogeneously distributed spherical-shaped nanocapsules. Cell viability assay with NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™ cells showed no cytotoxicity to them in the presence of mixed NC with dilution factors of up to 15% (v/v). For the photodynamic activity assay, 1% and 5% (v/v) diluted mixed NC were used with *Candida albicans* ATCC® 90028™ yeasts and, unlike for NIH/3T3 cells, mixed NC showed fungal toxicity in both the absence of light and in its presence with irradiation of 12 J/cm² and 25 J/cm². All results were statistically treated using the One-way ANOVA analysis of variance test followed by the Tukey t-test post-test for multiple comparisons (p <0.05).

Keywords: Nanocapsules. Phenyl-thio-phthalocyanine. Amphotericin B. Spectroscopy. Atomic Force Microscopy. Cytotoxicity. Antimicrobial Photodynamic Therapy.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<i>AMB</i>	Anfotericina B
<i>BHE</i>	Barreira HematoEncefálica
<i>d</i>	Diâmetro (nm)
<i>DLS</i>	Dynamic Light Scattering (Espalhamento Dinâmico da luz)
<i>DMSO</i>	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
<i>DP</i>	Desvio-Padrão
<i>KolliphorP188</i> poli(etilenoglicol)	Poli(etilenoglicol)-bloco-poli(propilenoglicol)-bloco poli(etilenoglicol)
<i>IC</i>	Intervalo de Confiança
<i>IUPAC</i>	International Union of Pure and Applied Chemistry (União Internacional de Química Pura e aplicada)
<i>LD</i>	Limite de detecção
<i>LPC</i>	Concentração do princípio ativo presente no sobrenadante da amostra
<i>LQ</i>	Limite de Quantificação
<i>Lipoid S100</i>	Fosfatidilcolina de soja
<i>MFA</i>	Microscopia de Força Atômica
<i>MFC</i>	Concentração Fungicida Mínima
<i>% m/v</i>	Porcentagem massa/volume
<i>N/m</i>	Newtons/metros
<i>NC</i>	<i>Nanocápsulas</i>
<i>NC/AMB</i>	Nanocápsulas com Anfotericina B

<i>NC/Vazia</i>	Nanocápsulas vazias
<i>NC/ZnS4Pc</i>	Nanocápsulas com Fenil-Tio-Ftalocianina de zinco
<i>NC/ZnS4Pc + AMB</i> Anfotericina B	Nanocápsulas com Fenil-Tio-Ftalocianina de zinco e Anfotericina B
<i>nm</i>	Nanômetros
<i>nm/min</i>	Nanômetros/minutos
<i>µg/mL</i>	Microgramas/mililitro
<i>OMS</i>	Organização Mundial de Saúde
<i>O₂</i>	Oxigênio molecular
<i>¹O₂[*]</i>	Oxigênio no estado singleto
<i>³O₂</i>	Oxigênio no estado tripleto
<i>Pdl</i>	Índice de polidispersão
<i>PDT</i>	Terapia Fotodinâmica
<i>aPDT</i>	Terapia Fotodinâmica antimicrobiana
<i>PLGA</i>	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
<i>POP</i>	Procedimento Operacional Padrão
<i>PS</i>	Fotossensibilizador
<i>¹PS</i>	Fotossensibilizador no estado fundamental
<i>¹PS[*]</i>	Fotossensibilizador no estado singleto
<i>³PS[*]</i>	Fotossensibilizador no estado tripleto
<i>R</i>	Coeficiente de Correlação
<i>R²</i>	Coeficiente de Determinação
<i>rpm</i>	Rotações por minuto

<i>ROS</i>	Espécies reativas de Oxigênio
<i>Sp</i>	Solução padrão
<i>SNC</i>	Sistema Nervoso Central
<i>T.E</i>	Teor de Encapsulação
<i>TPC</i>	Concentração total do princípio ativo na formulação
<i>UV</i>	Ultravioleta
<i>UV-Vis</i>	Ultravioleta-Visível
<i>ZnS4Pc</i>	Fenil-Tio-Ftalocianina de zinco
ζ	Potencial zeta

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análises físico-químicas de NC/Vazias pelo método do DLS.

Tabela 2 – Análises físico-químicas de NC/ZnS₄Pc pelo método do DLS.

Tabela 3 – Análises físico-químicas de NC/AMB pelo método do DLS

Tabela 4 – Análises físico-químicas de NC/ZnS₄Pc + AMB pelo método do DLS

Tabela 5 - Quantificação dos ativos nas NC/ZnS₄PC e NC/AMB

Tabela 6 - Quantificação dos ativos nas NC/ZnS₄PC + AMB

Tabela 7. Teor de encapsulação de ZnS₄Pc para NC/ZnS₄Pc

Tabela 8. Teor de encapsulação de ZnS₄Pc e AMB para NC/ZnS₄Pc + AMB

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas

Figura 2 – Estrutura molecular da Anfotericina B

Figura 3 – Mecanismo de ação da AMB.

Figura 4 – Estrutura e diferenciação dos principais PS derivados heterocíclicos utilizados em PDT

Figura 5 – Estrutura química do PS Zinco Fenil-Tio-Ftalocianina

Figura 6 – Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio medidas por luz

Figura 7 – Método de deposição interfacial do polímero pré-formado, também designado nanoprecipitação, descrito por Fessi et al. (1989)

Figura 8 – Espectrofotômetro GENESYSTM 10S UV-Vis- ThermoFisher Scientific e Espectrofluorímetro RF 6000 – Shimadzu

Figura 9 – Esquema representativo das etapas do experimento do teor de encapsulação

Figura 10 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/Vazia

Figura 11 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/Vazia

Figura 12 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/ZnS4Pc

Figura 13 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/AMB

Figura 14 – Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/ZnS4Pc + AMB

Figura 15 – Fotomicrografias tridimensionais obtidas das formulações NC/ZnS4Pc (A) e NC/ZnS4Pc + AMB (B) por Microscopia de Força Atômica

Figura 16 – Fotomicrografia tridimensional e perfil topográfico de NC/ZnS₄Pc (A) e NC/ZnS₄Pc + AMB (B) com medidas de diâmetro e altura provenientes da análise do software.

Figura 17 – Curva de espectro de absorção: de ZnS₄Pc livre (A) e AMB livre (B) em Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 1,275 µg.mL⁻¹ e 6 µg.mL⁻¹, respectivamente.

Figura 18 – Curva de espectro de emissão de ZnS₄Pc livre em ACN, ZnS₄Pc encapsulada (NC/ZnS₄Pc) em H₂O e NC/ZnS₄Pc + AMB em H₂O.

Figura 19 - Curva de espectro de absorção de ZnS₄Pc livre em 672 nm (A) correlacionando a máxima absorção e a concentração em DMSO variando de 0,255 – 2,04 µg.mL⁻¹ com equação da reta $y = 0,6053x + 0,0131$, $R = 0,9999$, e curva de espectro de absorção de AMB livre em 416 nm (B) correlacionando a máxima absorção e a concentração em DMSO variando de 0,5 – 10 µg.mL⁻¹ com equação da reta $y = 0,0752x + 0,0098$, $R = 0,9996$.

Figura 20 – Curva representativa da quantificação em triplicata de ZnS₄Pc e AMB para NC/ZnS₄Pc (A) e NC/AMB (B).

Figura 21 – Curva representativa da quantificação em triplicata de ZnS₄Pc e AMB para NC/ZnS₄Pc + AMB.

Figura 22 – Tempo de incubação em 0, 24 e 48 h de *C. albicans* com resazurina em PBS a 37° C.

Figura 23 – Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de NC Vazia e NC Mista em linhagem NIH/3T3 (fibroblastos de murino) utilizando resazurina, em que CT= controle somente com meio DMEN, A= NC Mista diluída a 1% (v/v), B= NC Mista diluída a 2,5% (v/v), C= NC Mista diluída a 5% (v/v), D= NC Mista diluída a 10% (v/v), E= NC Mista diluída a 15% (v/v), e F= NC vazia diluída a 15% (v/v).

Figura 24 – Ensaio de Atividade Fotodinâmica Antimicrobiana *in vitro* de NC Mista em *C. albicans* ATCC® 90028 utilizando resazurina, em que CT= controle somente com PBS, C1= NC Mista diluída a 1% (v/v) no escuro, C2= NC Mista diluída a 5% (v/v) no escuro, CTLD1= Controle com dose de luz 12 J/cm², C1LD1= NC Mista diluída a

1% (v/v) com dose de luz 12 J/cm², C2LD1= NC Mista diluída a 5% (v/v) com dose de luz 12 J/cm², CTLD2= Controle com dose de luz 25 J/cm², C1LD2= NC Mista diluída a 1% (v/v) com dose de luz 25 J/cm², C2LD2= NC Mista diluída a 5% (v/v) com dose de luz 25 J/cm².

Figura 25 – Ensaio de MFC com NC mistas diluídas a 1% e 5% (v/v) em PBS e doses de luz de 12 J/cm² e 25 J/cm² em que [A-D]1 = controles de dose luz (células em PBS + luz), [A-D]3 = leveduras com NC Mistas diluídas a 1% (v/v) e [A-D]5 = leveduras com NC Mistas diluídas a 5% (v/v).

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	19
2.1	RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS.....	19
2.2	ANFOTERICINA B.....	21
2.3	FTALOCIANINAS.....	24
2.4	TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT – “Antimicrobial Photodynamic Therapy”).....	28
2.5	NANOMATERIAIS POLIMÉRICOS E NANOPARTÍCULAS.....	32
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	36
3.2	ETAPAS DO TRABALHO.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	MATERIAIS.....	37
4.2	MÉTODOS.....	38
4.2.1	PROTOCOLO DE PREPARO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO FENILTIO-FTALOCIANINA DE ZINCO E ANFOTERICINA B.....	38
4.2.2	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS.....	40
4.2.2.1	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS E ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE.....	40
4.2.2.2	MEDIDA DO POTENCIAL ZETA.....	40
4.2.2.3	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA).....	41
4.2.3	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	42
4.2.4	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROANALÍTICO.....	43
4.2.4.1	LINEARIDADE.....	44
4.2.4.2	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ).....	44

4.2.5.....	QUANTIFICAÇÃO E TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DOS ATIVOS NA FORMULAÇÃO	45
4.2.6	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM RESAZURINA: PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE VIABILIDADE CELULAR.....	46
4.2.7	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS NIH/3T3 UTILIZANDO RESAZURINA.....	47
4.2.8	ENSAIO DE ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICRIANA (FOTOINATIVAÇÃO) E MFC.....	49
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS	52
5.1.1	DETERMINAÇÃO DO TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE E POTENCIAL ZETA DAS NANOCÁPSULAS.....	52
5.1.2	ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	57
5.2	DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO.....	60
5.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROANALÍTICO	63
5.3.1	LINEARIDADE.....	63
5.3.2	LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)	65
5.4	QUANTIFICAÇÃO E TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DOS ATIVOS NA FORMULAÇÃO	65
5.5	DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM RESAZURINA.....	70
5.6	ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS NIH/3T3 UTILIZANDO RESAZURINA	71
5.7	ENSAIO DE ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (FOTOINATIVAÇÃO) E MFC.....	73
6	CONCLUSÕES.....	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	78
8	APÊNDICES	87

1 INTRODUÇÃO

É muito difícil, senão impossível, pensar na medicina, ciência e arte de curar, sem nos referirmos aos “remédios” que a ela auxiliam desde sempre a cumprir seu objetivo. A história nos revela que na antiguidade as práticas terapêuticas foram envolvidas em rituais religiosos, específicos no que diz respeito às crenças particulares de cada povo, e acompanhadas pela utilização das chamadas ervas medicinais (MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). Hoje, com o conhecimento técnico-científico e avanço acelerado da ciência, muitas ervas e produtos de origem biológica e sintética deram origem aos medicamentos, como sendo poderosas ferramentas sem as quais as práticas médicas e terapêuticas não seriam possíveis. Em meio a esse cenário, houve um afã por novas descobertas e desenvolvimento de novos produtos visando melhorar os tratamentos médicos existentes e a qualidade de vida dos pacientes. Akkari *et al* (2016) cita, por exemplo, que desde a década de 1940 grandes empresas multinacionais do setor farmacêutico com forte investimento em P&D, cresceram de forma acelerada devido a um elevado número de lançamentos de medicamentos inovadores no mercado.

Assim, periodicamente, deparamo-nos com novas propostas medicamentosas que são lançadas no mercado, visando, de alguma forma, trazer novas esperanças terapêuticas. Os avanços mais recentes da ciência têm trabalhado com a ideia da nanotecnologia (FIGUEIRAS *et al.*, 2014), e não podia ser diferente na área de desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Polímeros (macromoléculas unidas repetida e continuamente) biodegradáveis dão origem a diferentes materiais que podem ser empregados na construção de reservatórios para o armazenamento e transporte de medicamentos (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanopartículas poliméricas representam esses reservatórios de tamanho nanométrico que tem por objetivo, por meio de diversos mecanismos, otimizar a terapia medicamentosa frente a uma enfermidade (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

A Anfotericina B (AMB) é um antifúngico pertencente à classe dos polienos. Foi descoberta e isolada em 1955, no Instituto Squibb para Pesquisas Médicas, a partir de culturas de *Streptomyces nodosus* presentes em amostras obtidas do solo do Rio Orinoco da Venezuela (FALCI; PASQUALOTTO, 2015; ARRUDA *et al.*, 2016). Sua eficácia e espectro de ação a promoveram ao patamar de fármaco de referência

no controle de infecções fúngicas (ARRUDA *et al.*, 2016). Vários artigos já foram publicados relatando a melhora dos efeitos de AMB quando veiculados por nanopartículas, como, por exemplo, para o tratamento de Paracoccidioidomicose (SOUZA *et al.*, 2015) e Leishmaniose cutânea (CASA *et al.*, 2018).

Devemos nos ater, contudo, que não só evoluíram as plataformas de veiculação dos medicamentos, como, também, várias substâncias já foram propostas e estudadas com a meta de serem reconhecidos como possíveis novos arsenais terapêuticos. Assim é, por exemplo, o que ocorreu com um grupo de corantes chamado ftalocianinas que já experimentou diversas modificações estruturais visando alcançar melhores propriedades físicas, químicas e farmacocinéticas (LI, X. *et al.*, 2017). As ftalocianinas representam uma classe de compostos heterocíclicos caracterizadas por um macrociclo central conjugado por quatro unidades de diiminoisindolinas unidas por átomos de nitrogênio (MELVILLE *et al.*, 2015). A partir da década de 1930, após as ftalocianinas serem estruturalmente definidas e nomeadas, ocuparam um lugar de destaque na indústria têxtil e de corantes devido a sua estabilidade térmica, baixa solubilidade e reatividade (GOBO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Sua aplicação, contudo, não se restringe a essas áreas, tendo aplicação em outras, tais como: células solares (VAROTTO *et al.*, 2010), materiais semicondutores (BECHTOLD *et al.* 2012), Terapia Fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) (CARMELLO *et al.*, 2016), dentre outros.

Como se pôde notar, as ftalocianinas também são utilizadas na Terapia Fotodinâmica (PDT), que representa uma nova modalidade terapêutica cuja proposta é promover o tratamento de uma determinada enfermidade pela combinação de oxigênio molecular, substância sensível à luz – Fotossensibilizador (PS) e, claro, a presença da luz em um determinado comprimento de onda específico capaz de excitar o PS (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010)

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS

Atualmente, o mundo vive em alerta quanto às infecções, sejam elas de origem fúngica ou bacteriana, pois o progresso da resistência desses microrganismos frente aos arsenais farmacológicos está aumentando em uma velocidade maior do que a que se produzem novos agentes antimicrobianos. O relatório da Organização Mundial de Saúde (OMS) de 2012 sobre a crescente ameaça da resistência antimicrobiana diz que a resistência aos antimicrobianos não é um fenômeno recente, mas um problema crítico de saúde nos dias de hoje (OMS, 2012). É também, por exemplo, uma preocupação abordada pelo Grupo de Coordenação Interagências para Resistência Antimicrobiana (IACG) criado pelo secretário geral das Nações Unidas, e que reúne parcerias com especialistas em saúde humana, animal e vegetal, bem como toda a Organização das Nações Unidas (ONU), organizações internacionais e Organização Mundial da Saúde (OMS) (IACG, 2019). Segundo o relatório para o secretário geral das Nações Unidas, a resistência antimicrobiana é uma crise de nível mundial ameaçando os progressos, de um século, alcançados na área da saúde (IACG, 2019). Doenças que apresentam resistência aos medicamentos antimicrobianos já são responsáveis por causar, no mínimo, 700.000 mortes por ano em todo o mundo (IACG, 2019). Se nenhum esforço para conter a resistência aos antimicrobianos for sustentada, só nos países de rendimentos elevados, por volta de 2,4 milhões de pessoas poderão morrer entre 2015 e 2050, além, também, dos impactos econômicos gerados aumentando a pobreza e as desigualdades (IACG, 2019).

Em decorrência da existência de poucos antifúngicos disponíveis no mercado associada a ampla disseminação do uso dos mesmos devido ao aumento da

incidência de infecções oportunistas por *Candida spp*, tal fato resulta na evolução da resistência a tais medicamentos (SHEIKH *et. al.*, 2013). Nesse meio, as infecções fúngicas sistêmicas representam um problema emergente na prática clínica atual, tendo o aumento de sua incidência devido, principalmente, ao uso intensivo de cateteres intravasculares e utilização de antibióticos de largo espectro com maior frequência associadas à imunossupressão, tais como transplantes, tratamentos quimioterápicos e síndrome da imunodeficiência adquirida. Essas infecções fúngicas sistêmicas apresentam elevada morbimortalidade, não obstante a aplicação de terapia antifúngica adequada (FALCI; PASQUALOTTO, 2015). Nos últimos anos, a incidência de falhas no tratamento aumentou acentuadamente em pacientes com uso de terapia prolongada, representando, assim, um sério problema no tratamento de tais infecções (SHEIKH *et. al.*, 2013).

Uma proposta levantada pelo relatório da IACG para combate à resistência antimicrobiana pauta-se no eixo “*Inovar para acautelar o futuro*” que, dentre várias recomendações, apela para o investimento e inovação em antimicrobianos de qualidade garantida, novos compostos e alternativas seguras e eficazes aos antimicrobianos para a saúde humana, animal e vegetal (IACG, 2019). Considerando tais apelos, é possível tentar cumpri-los com a utilização de novas moléculas e terapias, a saber, moléculas fotossensíveis utilizadas em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana (aPDT), bem como a implementação de novas formas de veiculação dos fármacos que consigam produzir melhores resultados terapêuticos com consequente diminuição do abuso de seu uso e toxicidade, como, por exemplo, a utilização de nanopartículas,

2.2 ANFOTERICINA B

Em 1958, a Anfotericina B (AMB) (Figura 2) foi utilizada pela primeira vez no tratamento de paracoccidioidomicose e, posteriormente, nas demais infecções fúngicas provenientes de outras espécies de fungos (ARRUDA *et al.*, 2016), sendo, por exemplo, a base fundamental na terapia da criptococose disseminada (doença fúngica com maior impacto em mortalidade no mundo, causando mais de 600.000 mortes/ano) (FALCI; PASQUALOTTO, 2015).

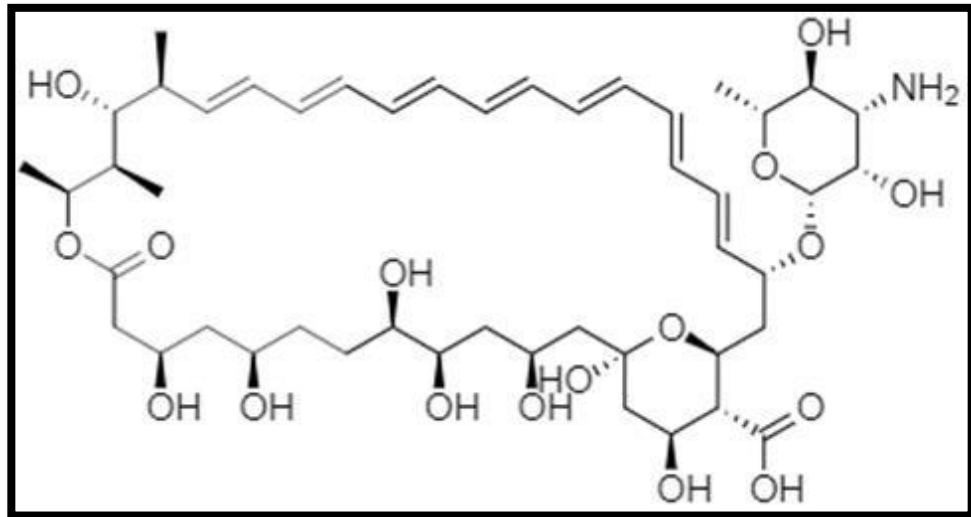


Figura 2. Estrutura molecular da Anfotericina B. Fonte: Próprio autor

O mecanismo de ação da AMB não está, até o momento, completamente elucidado. Entretanto, sabidamente apresenta seus efeitos de duas maneiras distintas (Figura 3), sendo aqueles ocasionados diretamente sobre a membrana celular e os intracelulares por meio da indução de estresse oxidativo (MESA-ARANGO *et al.*, 2012; FALCI; PASQUALOTTO, 2015).

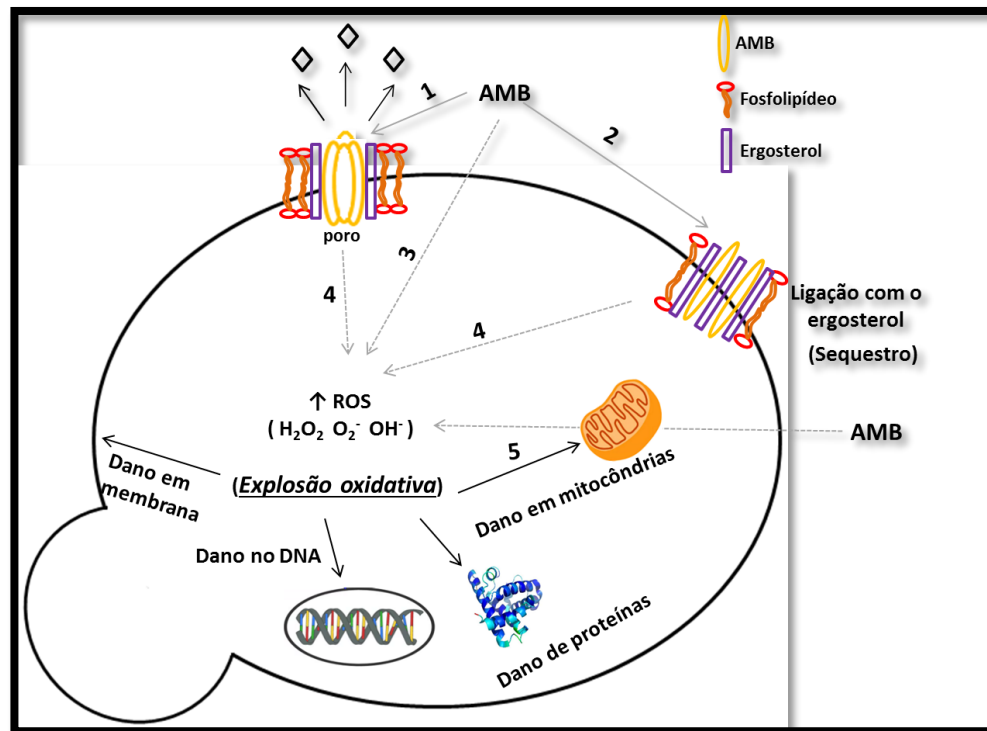


Figura 3. Mecanismo de ação da AMB. Efeitos diretos sobre a membrana: Ligação com o ergosterol (1), sequestro de ergosterol (2), Efeitos intracelulares: AMB agindo como pró-oxidante(3), produção de espécies reativas de oxigênio com prévia ligação ao ergosterol(4) e influência na atividade mitocondrial(5). Fonte: Adaptação de MESA-ARANGO *et al.*, 2012)

O efeito direto sobre a membrana plasmática ocorre devido a interação com as moléculas de ergosterol, enquanto que os efeitos intracelulares pela indução de estresse oxidativo geram espécies reativas de oxigênio (MESA-ARANGO *et al.*, 2012). A AMB, na membrana, pode se ligar ao ergosterol (1) e criar poros, ou apenas induzir o sequestro de ergosterol (2), resultando em uma interrupção da estabilidade da membrana (MESA- ARANGO *et al.*, 2012). Dentro da célula, a AMB também conduz uma explosão oxidativa. O mecanismo dessa condução permanece desconhecido, mas existem várias possibilidades: o AMB pode agir diretamente como um pró-oxidante (3) e, assim, promover o acúmulo de espécies reativas de oxigênio (ROS) (MESA-ARANGO *et al.*, 2012). No entanto, também é possível considerar que este efeito intracelular exija ligação prévia ao ergosterol (4) (MESA-ARANGO *et al.*, 2012). Uma vez que os ROS são produtos naturais da cadeia respiratória, não

pode ser descartada a possibilidade de a AMB influenciar a atividade mitocondrial (5), e contribuir dessa maneira para a explosão oxidativa (MESA-ARANGO *et al.*, 2012). O acúmulo de radicais livres apresenta múltiplos efeitos nocivos sobre os componentes essenciais da célula (membrana, proteínas, DNA e mitocôndrias) resultando em morte celular (MESA-ARANGO *et al.*, 2012).

Não obstante a AMB possui maior afinidade pelo ergosterol, muitos de seus efeitos tóxicos decorrem de sua ligação ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (ARRUDA *et al.*, 2016). Um dos efeitos adversos importantes e que gera bastante atenção e preocupação durante a utilização da AMB é a sua nefrotoxicidade. A AMB é uma molécula anfipática, mas tem como característica geral ser insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, bem como na água (FALCI; PASQUALOTTO, 2015; ARRUDA *et al.*, 2016).

Tais características, como as acima citadas, estabelecem um perfil insignificante de absorção por via oral. Em vista de resolver essa problemática, vários estudos têm sido realizados no sentido de elaborar sistemas de carreamento de fármacos com habilidades de diminuir a toxicidade e melhorar o perfil de dissolução da AMB, estando, entre eles, as nanopartículas (FALCI; PASQUALOTTO, 2015; ARRUDA *et al.*, 2016).

Existem formulações lipídicas de AMB disponíveis no mercado como, por exemplo, a AMB lipossomal (Ambisome®), cuja utilização trouxe melhoras consideráveis e expressivas no que diz respeito a diminuição da toxicidade em relação a AMB livre. Um ensaio clínico randomizado, multicêntrico, duplo-cego conduzido por Walsh *et al.*, (1999), citado por Falci e Pasqualotto, (2015, p. 68), para o tratamento empírico de infecções fúngicas invasivas demonstrou, com um $p < 0,001$, que a nefrotoxicidade da AMB lipossomal ocorreu em 19% dos pacientes, enquanto

que, para a AMB livre, 34% dos pacientes apresentaram o referido problema (FALCI; PASQUALOTO, 2015), mantendo-se, no entanto, o sucesso do tratamento clínico de forma bastante similar de 50% e 49%, respectivamente (FALCI; PASQUALOTO, 2015). Tal fato demonstra o potencial conduzido pelos sistemas de carreação de fármacos justificando, assim, estudos que possam se utilizar dessa tecnologia para buscar progressivos aprimoramentos.

Por fim, é importante considerar que a AMB pode se apresentar com três formas distintas, quais sejam a monomérica, oligomérica e agregada, dependendo da sua concentração (FILIPIN; SOUZA, 2006). Em baixas concentrações ($5,0 \cdot 10^{-7}$ mol/L) no meio aquoso, há a presença de quatro bandas entre 320 e 420 nm, cujo comportamento é característico de sua forma monomérica. Elevando-se a concentração para $5,0 \cdot 10^{-5}$ mol/L há uma modificação do espectro com o surgimento de uma banda achatada e intensa próxima de 340 nm assinalando a aparição das formas agregadas (FILIPIN; SOUZA, 2006). A formação de canais em membranas que contenham ergosterol foi verificada para AMB tanto na forma monomérica quanto agregada, embora, para as membranas com colesterol, apenas as formas agregadas foram capazes de formar tais canais (FILIPIN; SOUZA, 2006). Deste modo, a própria concentração de AMB empregada já possibilita a maior ou menor aptidão para se ligar as membranas contendo colesterol presentes nas células de humanos.

2.3 FTALOCIANINAS

A busca por novas moléculas fotoativas com potencial nocivo para bactérias, fungos e vírus têm impulsionado intensivas pesquisas (DLUGASZEWSKA *et al.*, 2017) e, dentre essas moléculas, encontramos os corantes fenotiazínicos (azul de metileno

e azul de toluidina), porfirinas e derivados de porfirina e as ftalocianinas (DLUGASZEWSKA *et al.*, 2017).

A partir da década de 1930, após as ftalocianinas serem estruturalmente definidas e nomeadas, ocuparam um lugar de destaque na indústria têxtil e de corantes devido a sua estabilidade térmica, baixa solubilidade e reatividade (GOBO, 2013; OLIVEIRA *et al.*, 2014). Sua aplicação, contudo, não se restringe a essas áreas, tendo aplicação em outras tais como: células solares (VAROTTO *et al.*, 2010), materiais semicondutores (BECHTOLD *et al.*, 2012), aPDT (CARMELLO *et al.*, 2016), dentre outros. Para aplicação em PDT, as ftalocianinas atuam como fotossensibilizadores (PS) e destacam-se pela intensa absorção na região do vermelho 650-800 nm, região esta em que há maior penetração da luz em tecidos biológicos, além, também, de excelentes rendimentos de produção de oxigênio singlete (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Atualmente, os principais compostos PS utilizados para PDT são derivados químicos das clorinas, porfirinas, bacterioclorinas e ftalocianinas (Figura 4) (GOBO, 2013 ; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

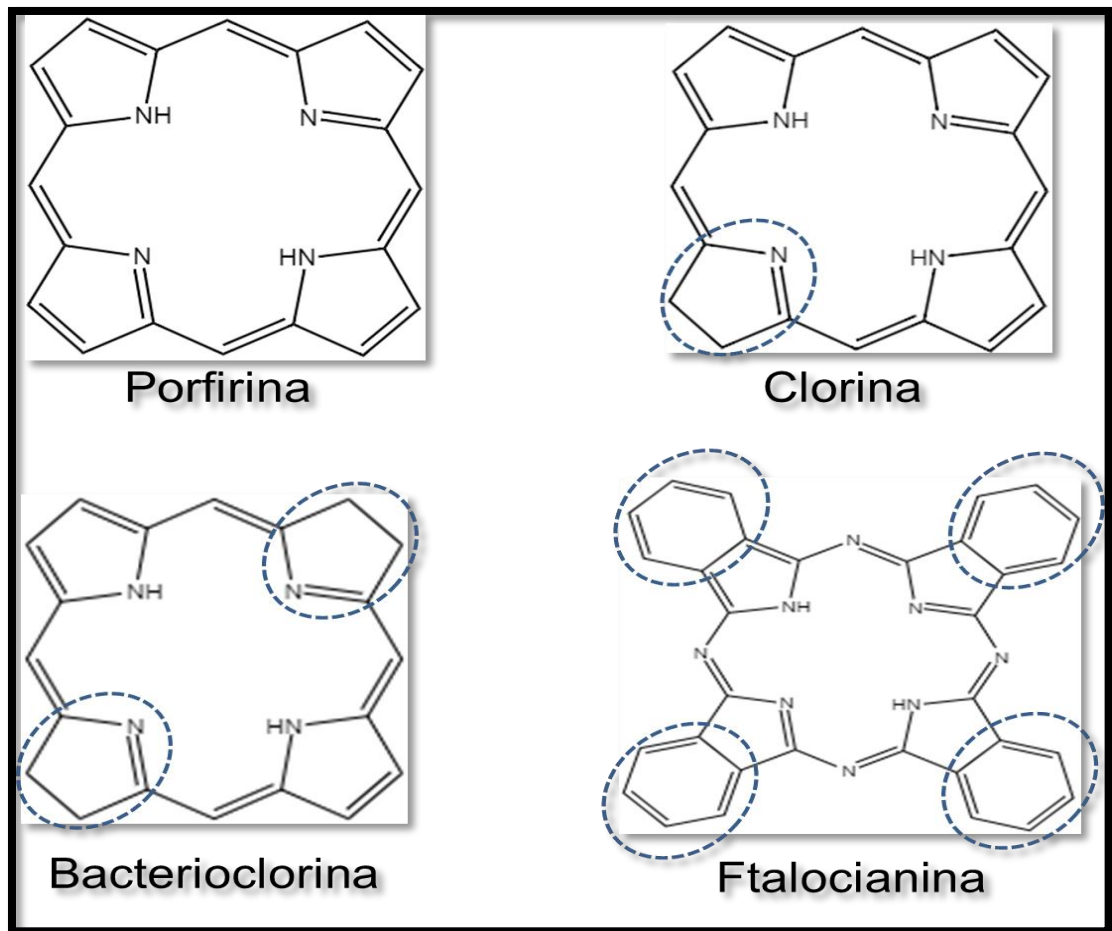


Figura 4. Estrutura e diferenciação dos principais PS derivados heterocíclicos utilizados em PDT.

Devido as suas propriedades físico-químicas e potenciais aplicações em tecnologia e medicina, as ftalocianinas, compostos heterocíclicos relacionados às porfirinas, foram amplamente estudadas. Substituições periféricas e no núcleo central das ftalocianinas promovem alterações de suas propriedades físico-químicas possibilitando utilizá-las em estudos biológicos *in vitro* e *in vivo* (DLUGASZEWSKA *et al.*, 2017). São consideradas como uma classe de fotossensibilizadores de alta eficiência caracterizadas por um macrociclo central formado pela conjugação de quatro unidades de diiminoisindolinas unidas por átomos de nitrogênio, e, geralmente, contém um íon metálico diamagnético em seu núcleo (CHEN *et al.*, 2014; MELVILLE *et al.*, 2015). Dentro do seu núcleo central, as ftalocianinas têm potencial

para ligação com mais de 70 íons metálico e não metálicos, dando origem as metalofteralocianinas (ERTEM *et al.*, 2018) sendo bastante conhecidas e estudadas, por exemplo, as associações com Alumínio, Cloro e Zinco

Dentre as diferentes metalofteralocianinas encontramos uma, cuja denominação IUPAC é zinco 2,9,16,23-tetrakis(feniltio)-29H,31H-ftalocianina, molécula alvo de nosso estudo, e que denominamos como Fenil-Tio-ftalocianina de Zinco (ZnS₄Pc) (Figura 5)

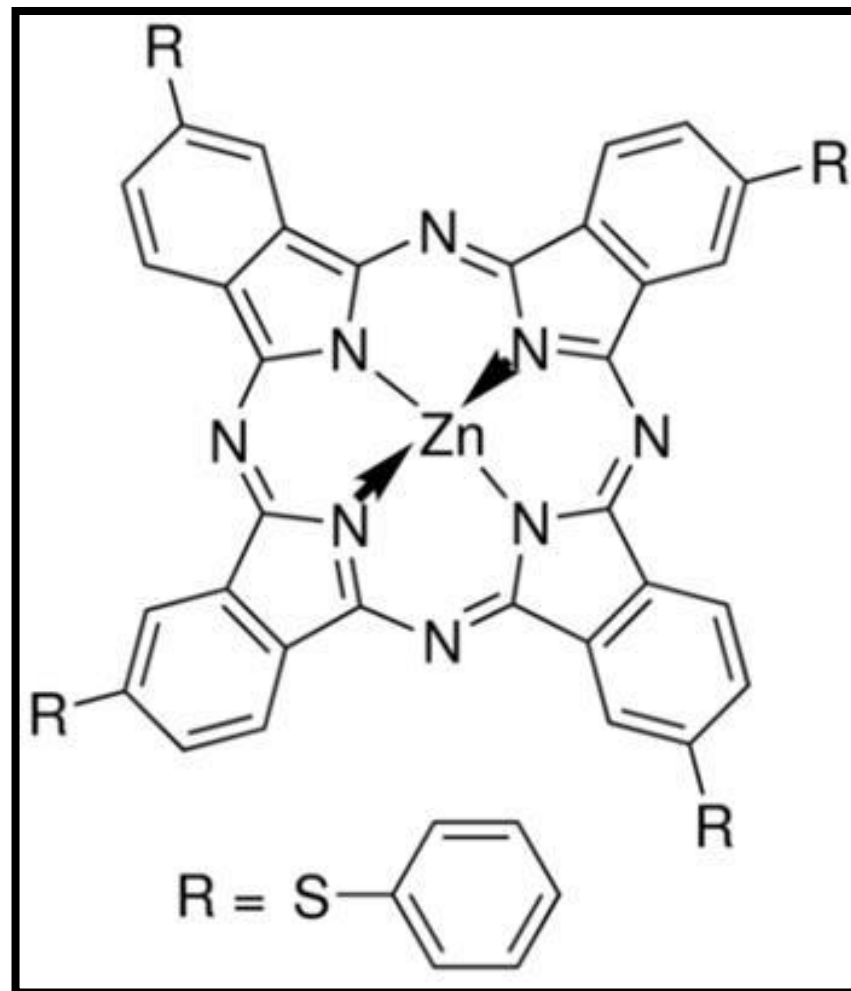


Figura 5. Estrutura química do PS Zinco Fenil-Tio-Ftalocianina. Fonte: Sigma-Aldrich.

2.4 TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (aPDT – “Antimicrobial Photodynamic Therapy”)

A luz é um dos elementos fundamentais da natureza e indispensável para a vida vegetal, base da cadeia alimentar. Portanto, todos os seres vivos de alguma forma utilizam-se da luz solar para obtenção de energia que lhes possibilitem a manutenção da vida. Hoje, com a evolução científica em todas as áreas e, sobretudo na biologia, entendemos a real importância da luz no processo da fotossíntese, tão importante na existência da vida vegetal (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

Muitas das funções da luz, no que diz respeito às suas implicações biológicas, já foram elucidadas, embora, há muito tempo, a luz, nas suas mais diversas formas, tem sido utilizada para além de suas funções primordiais (OLIVEIRA *et al.*, 2014). Hönigsmann (2013) relata a existência do tratamento de doenças com luz solar (helioterapia) durante muitos séculos; narra, por exemplo, que há mais de 3500 anos, os antigos egípcios e curandeiros indianos tratavam leucoderma por meio da ingestão de infusões ou sementes de plantas combinada com a exposição de luz solar. Entretanto, somente nos séculos XIX e XX começou-se a melhor propagar o uso de luz ultravioleta e visível (UV-Vis) no combate de diversas doenças, resultando no prêmio Nobel de medicina, em 1903, de Niels Ryberg Finsen pelos significativos resultados obtidos no combate de *Lupus vulgaris* por luz UV (OLIVEIRA *et al.*, 2014). A PDT é uma reação química ativada por luz utilizada para destruir, seletivamente, um tecido, reclamando, para isso, de um agente fotossensibilizador no tecido-alvo, uma fonte de luz e oxigênio molecular (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010). A PDT é similar à aPDT, cuja diferenciação reside nas células alvos do tratamento, quais sejam células tumorais e células microbianas, respectivamente, porquanto o mecanismo de ação da terapia é o mesmo

(DLUGASZEWSKA *et al.*, 2017). Foi descoberta há mais de cem anos, por volta de 1900, por meio de uma feliz descoberta ao acaso em que protozoários do gênero *Paramecium* foram mortos quando expostos, simultaneamente, ao corante acridina (um PS) e a luz solar (HAMBLIN, 2016).

Entretanto, com o passar do tempo a PDT foi estudada quase que exclusivamente para o tratamento de câncer até o início da década 1990, quando se deduziu que a PDT também poderia exercer um poderoso efeito antimicrobiano caso fosse projetado e utilizado PS que se ligassem seletivamente às células microbianas (HAMBLIN, 2016). Esta terapia compõe-se de três fases: excitação do PS incluindo o tempo de pré-incubação, produção de espécies reativas de oxigênio e morte celular (RIBEIRO *et al.*, 2012). Na primeira fase, a fonte de luz transfere energia para o PS, cuja molécula absorve esta energia transmutando para o estado excitado denominado singlete, a partir do qual, posteriormente, atinge o estado excitado tripleto transferindo a energia absorvida para as moléculas de oxigênio (reação do tipo II) ou para outras moléculas que interagem com o oxigênio (reação do tipo I) (RIBEIRO *et al.*, 2012). Na Figura 6, é demonstrado um esquema simplificado das reações do tipo I e II a partir dos estados excitados de maior energia do PS.

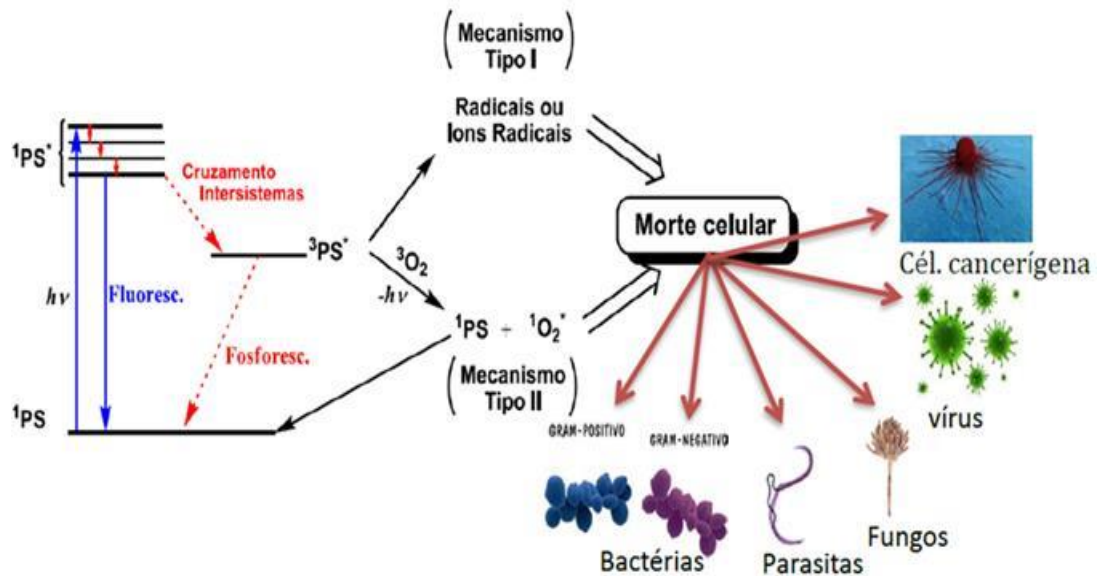


Figura 6. Diagrama de Jablonski simplificado – mecanismo geral de geração de espécies reativas de oxigênio medidas por luz. Fonte:(OLIVEIRA *et al.*, 2014) adaptado e modificado.

A molécula de fotossensibilizador no estado fundamental (1PS), após absorver um fóton com comprimento de onda adequado do espectro visível, ganha a energia necessária para alcançar seu estado mais energético denominado singlete ($^1PS^*$). Neste estado, o fotossensibilizador pode seguir três caminhos: retornar ao 1PS pela dissipação da energia ganha na forma de calor ou reemitindo esse fóton pelo fenômeno da fluorescência. Pode ainda a partir da admissão do processo de inversão de spin, denominado cruzamento de intersistemas, ir para um estado excitado de menor energia denominado tripleto ($^3PS^*$). Quando estando neste estado, o fotossensibilizador, novamente, pode assumir mais de um caminho: voltar ao 1PS consoante a dissipação de energia na forma de calor ou reemitindo o fóton por outro fenômeno conhecido como fosforescência. Entretanto, muitos fotossensibilizadores são capazes de, no estado $^3PS^*$, apresentar energias adequadas para transferi-la ao oxigênio molecular (O_2) (reação do tipo II), presente naturalmente no estado tripleto (3O_2), fazendo-o alcançar o estado de maior energia singlete ($^1O_2^*$). Este, por sua

vez, é excessivamente reativo no que tange ao ataque de moléculas biológicas e consequente morte celular. Pode acontecer, também, de o $^3\text{PS}^*$ gerar espécies radicalares ou peróxidos de hidrogênio (reação do tipo I) que também levam a morte celular. A maior ocorrência da reação do tipo I ou II depende das características intrínsecas do PS e o meio celular, mas qualquer um dos dois leva a formação de espécies reativas de oxigênio, sendo que em geral a produção de $^1\text{O}_2^*$ é o mais relevante na PDT (GOBO, 2013; RIBEIRO *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014; HAMBLIN, 2016). Portanto, estes dois mecanismos fotooxidativos, capazes de produzir espécies reativas de oxigênio são descritos, sendo que na reação do tipo II o PS interage diretamente com as moléculas de oxigênio molecular, enquanto que na reação do tipo I há um composto intermediário que reage primeiro com o PS e depois com o oxigênio (RIBEIRO *et al.*, 2012).

Um PS deve apresentar algumas características particulares importantes para a aplicação em PDT/aPDT, quais sejam o bom rendimento quântico de espécies reativas de oxigênio, ser atóxico na ausência de luz, mostrar seletividade para células doentes ou microbianas ao invés das células humanas saudáveis em curtos períodos de incubação, fotossensibilidade não prolongada, farmacocinética favorável (adequada eliminação do corpo), baixa agregação em soluções (principalmente aquosas/biológicas), e a mais importante é apresentar carga catiônica fornecida por átomo de nitrogênio quaternário ou grupos básicos amino (OLIVEIRA *et al.*, 2014 ; HAMBLIN, 2016).

O sucesso do tratamento de alguns agentes terapêuticos é prejudicado, em algum momento, pelo desenvolvimento potencial de tolerância ou resistência; Essa é uma verdade presente quando pensamos nos medicamentos antibióticos, antifúngicos, antiparasitários, antivirais e até para aqueles usados no tratamento de

doenças crônicas, como câncer e diabetes (DAVIES, J.; DAVIES, D., 2010) acontecendo em doenças causadas ou sofridas por organismos vivos, incluindo humanos, animais, peixes, plantas, insetos, etc; Muitas resoluções, recomendações e relatórios já foram propostos e escritos, porém sem sucesso, considerando que o desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos é implacável (DAVIES, J.; DAVIES, D., 2010). A redução do uso inadequado de antimicrobianos com consequente diminuição do desenvolvimento da resistência microbiana pode ocorrer por meio do auxílio da aPDT. Esta é uma alternativa promissora na batalha contra infecções localizadas de microrganismos (MELO *et al.*, 2012).

2.5 NANOMATERIAIS POLIMÉRICOS E NANOPARTÍCULAS

A prática médica atual, quando comparada à do século passado, sofreu incontáveis avanços, inclusive no que tange a doenças antes intratáveis (SHEINGOLD; HAHN, 2014; RIZVI; SALEH, 2017). Muitos medicamentos foram desenvolvidos para o tratamento de diversas doenças. É inegável a velocidade do avanço tecnológico que o mundo está enfrentando, e não é diferente com a área da Saúde. Tal avanço associado com suas aplicações no campo de medicamentos e produtos farmacêuticos revolucionou o século XX (NIKALJE, 2015). No universo científico, a nanofísica tem ganhado cada vez mais notoriedade revelando suas potencialidades multidisciplinares a começar pelos diferentes campos de aplicabilidade, como por exemplo, a engenharia, a química e ciências da vida (SATTLER, 2010). Na nanociência, a escala de trabalho é do tamanho nanométrico, isto é, 10^{-9} m. Muitas pesquisas têm sido realizadas em torno dos nanomateriais para aplicação em várias áreas, especialmente a médica. Eles são projetados e

nanodimensionados utilizando diferentes materiais obtendo-se estruturas com dimensões semelhantes a certas classes de macromoléculas como peptídeos e proteínas, além de dispositivos biológicos como vírus e outras estruturas macromoleculares de composição biológica (LEE *et al.*, 2017). Desse modo, há um interesse nobre para o aumento da importância desses sistemas nanoestruturados de carreação de fármacos, tais como as nanopartículas, cuja origem reside em seu potencial para revolucionar a medicina moderna (BANIK *et al.*, 2016).

São inúmeros os motivos pelos quais o uso de nanopartículas é importante. A eficácia de muitos medicamentos é frequentemente limitada pela sua baixa concentração no sítio alvo e distribuição sistêmica pelo organismo; além disso, com a necessidade das altas dosagens para o efeito terapêutico, aumenta-se o risco de toxicidade e efeitos adversos, justificando-se, assim, pesquisas que busquem o desenvolvimento de novos sistemas que aperfeiçoem a terapia (TIYABOONCHAI, 2003). É pensando em solucionar tais problemas, que o avanço na área de desenvolvimento de carreadores de fármacos é progressivo, o que é confirmado, por exemplo, pela presença de mais de 360.000 artigos publicados nesta área na base de dados científicos do *Science Direct* até Abril de 2019.

Sistemas carreadores nanoparticulados apresentam como vantagens a possibilidade de direcionamento a tecidos específicos, melhor taxa de dissolução (devido ao seu tamanho reduzido associado a grande área superficial) aumentando sua biodisponibilidade, superação da resistência oferecida pelas barreiras fisiológicas, diminuição da toxicidade, melhor índice terapêutico, entre outros (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; RAWAT, 2006).

As nanopartículas podem ser preparadas com polímeros ou lipídios, e apresentam diâmetro submicrônico. Quanto a classificação, elas podem ser

nanoesferas ou nanocápsulas (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003; LI, Q *et al.*, 2017), havendo, portanto, uma distinção entre elas proveniente da composição e organização estrutural (Figura 1) (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). As nanocápsulas compõem-se de um núcleo de natureza lipídica envolto por uma camada de material polimérico, cujo fármaco pode estar adsorvido neste ou dissolvido no núcleo hidrofóbico. Em contrapartida, as nanoesferas não apresentam um núcleo distinto em sua composição que é isenta de óleo, formadas, apenas, por uma matriz polimérica em que o fármaco fica retido ou adsorvido (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

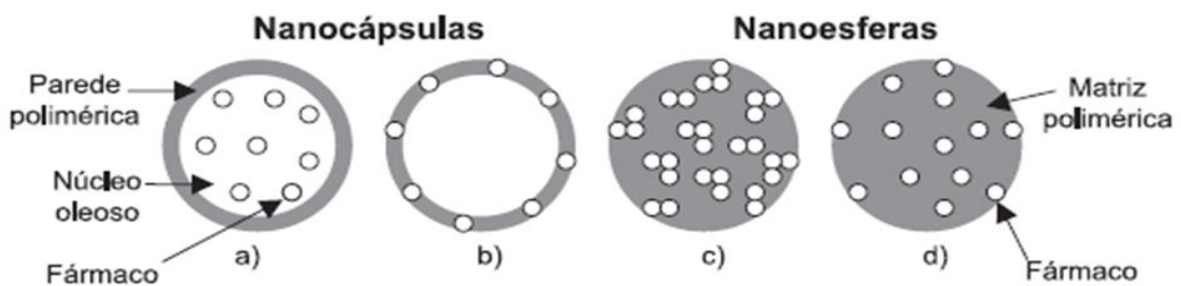


Figura 1. Representação esquemática da estrutura de nanocápsulas e nanoesferas poliméricas: a) representação de uma nanocápsula cujo fármaco está dissolvido no núcleo oleoso; b) representação de uma nanocápsula cujo fármaco está adsorvido à parede polimérica; C) representação de uma nanoesfera cujo fármaco está retido na matriz polimérica; d) representação de uma nanoesfera cujo fármaco está adsorvido ou disperso na matriz polimérica. Fonte:(adaptado de SCHAFFAZIK *et al.*, 2003).

As nanocápsulas poliméricas (NC) são constituídas de polímeros biodegradáveis e demonstram propriedades interessantes, tais como estabilidade durante o armazenamento e em fluidos biológicos, bem como atravessar a barreira hematoencefálica (BHE) acessando o Sistema Nervoso Central (SNC), adentrar por entre as estreitas junções das células endoteliais da pele (RIZVI; SALEH, 2017), penetração em tecidos concentrando-se principalmente no fígado e medula óssea, rica em fagócitos monucleares, permitindo seu emprego em doenças que tem como alvo estas células, entre outros (LI, Q *et al.*, 2017). Tais potencialidades terapêuticas

têm chamado à atenção dos pesquisadores. Comparadas aos lipossomas, as NC podem alcançar com mais efetividade a entrega de fármacos em áreas alvo específicas, como órgãos ou tecidos com alterações patológicas. Assim, aumentam a eficácia dos fármacos reduzindo, simultaneamente, os efeitos colaterais em tecidos normais que rodeiam o órgão alvo doente (LI, Q *et al.*, 2017).

Encontramos na literatura várias metodologias de síntese de nanopartículas poliméricas, cujo emprego leva em consideração as características físico-químicas do fármaco e sua aplicação (CRUCHO; BARROS, 2017). De uma maneira geral podemos classificá-las em duas categorias distintas cuja diferença, no modo de preparo das nanopartículas, se dá por reações de polimerização de monômeros ou de polímeros pré-formados (CRUCHO; BARROS, 2017). Os métodos envolvendo polimerização de monômeros apresentam alguns inconvenientes que limitam o seu uso, podendo citar a formação a partir de monômeros não biodegradáveis ou de biodegradação lenta, como, também, a formação de subprodutos tóxicos que exigem uma elaborada etapa de purificação posterior para chegar a um produto farmacêutico aceitável (CRUCHO; BARROS, 2017). Assim, com a finalidade de evitar tais limitações, ganha mais atenção os métodos que envolvem os polímeros pré-formados, cuja vantagem está em evitar tais problemas, além de serem mais facilmente controláveis e ter maior rendimento (SOUTO *et al.*, 2012).

A literatura científica descreve várias técnicas de produção de nanopartículas a partir de polímeros pré-formados, como, por exemplo, a emulsificação por evaporação de solvente, emulsificação por difusão de solvente, “salting-out”, nanoprecipitação, difusão em sacos de diálise e tecnologia de fluido supercrítico (CRUCHO, 2017). Por regra, a solubilidade do princípio ativo determina a escolha do

método de preparação (SOUTO *et al.*, 2012) e, para a obtenção de nanopartículas com propriedades desejadas, a escolha mais adequada tem papel fundamental.

O presente trabalho propõe a produção de nanocápsulas poliméricas mistas a partir do método de deposição interfacial de polímero pré-formado, técnica de nanoprecipitação, e cujo emprego é considerado usual e eficiente para encapsulação de substâncias hidrofóbicas (MILADI *et al.*, 2015) com o intuito de avaliar atividade antifúngica contra *Candida albicans* aplicando-se a aPDT.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Desenvolver e caracterizar, do ponto de vista físico-químico, e fotobiológico, nanocápsulas poliméricas contendo a combinação de ZnS₄Pc e AMB para avaliação antifúngica *in vitro* contra *Candida albicans* aplicando-se a aPDT, além de propor um novo fotossensibilizador para aplicação em aPDT, contribuindo para novas formas de tratamento que possam diminuir a toxicidade e complementar a terapia convencional.

3.2 ETAPAS DO TRABALHO

- Desenvolvimento das nanocápsulas poliméricas para liberação controlada dos ativos ZnS₄Pc e AMB.
- Determinação dos parâmetros físico-químicos da formulação.
- Determinação das características morfológicas das nanocápsulas.
- Determinação da concentração dos ativos nas nanocápsulas.
- Ensaio de viabilidade celular (Citotoxicidade) com linhagem celular

NIH/3T3

- Ensaio de atividade fotodinâmica antimicrobiana e Concentração Fungicida Mínima

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS

A água utilizada para o preparo das formulações foi do tipo ultrapura obtida do sistema Gehaka *Master System All Wfi*, São Paulo. Para o preparo das nanocápsulas (NC), os seguintes reagentes químicos foram utilizados: Poli(ácido lático-co-glicólico) (PLGA) (Sigma- Aldrich), Fosfatidilcolina de soja – Lipoid S100[®], óleo de soja (Sigma-Aldrich co. St. Louis, MO, EUA) e Poli(etilenoglicol)-bloco-poli(propilenoglicol)-bloco-poli(etilenoglicol) - (Kolliphor P188) (Sigma-Aldrich). Os compostos utilizados foram a AMB adquirida da empresa Inlab Confiança e a ZnS₄Pc adquirida da Sigma-Aldrich. Foram utilizados solventes orgânicos de grau analítico como a acetona (J T Baker) e o dimetilsulfóxido (DMSO) (LS Quimicals).

Para os ensaios de viabilidade celular (citotoxicidade), foram empregados linhagens de células NIH/3T3 ATCC[®] CRL-1658[™] meio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Gibco BRL, EUA) suplementado com 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 2,0 mmol.L⁻¹ de glutamina, 0,1 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 10% de soro fetal bovino (SFB) (Cultlab, Campinas/Brasil) além, também, de tripsina (Gibco BRL, EUA), solução tampão fosfato salino (PBS 1x, pH 7,4 Sigma) e placas de microtitulação de 96 poços.

Os ensaios de atividade fotodinâmica antimicrobiana utilizaram leveduras de *Candida albicans* ATCC[®] 90028[™], meio caldo Sabouraud dextrosado, placas de

microtitulação de 24 poços e fontes de Luz do tipo LED de 660 nm de 12 mW/cm² acopladas a uma Biotable de 24 poços e (PBS 1x, pH 7,4 Sigma).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 PROTOCOLO DE PREPARO DAS NANOCÁPSULAS CONTENDO FENILTIO-FTALOCIANINA E ANFOTERICINA B

As NC poliméricas foram preparadas na concentração de 0,05 mg.mL⁻¹ de AMB e de ZnS₄Pc pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado conforme descrito por Fessi *et al.* (1989), com modificações. A emulsificação espontânea da fase orgânica interna (que contém o polímero) na fase aquosa externa é o que caracteriza tal método (SILVA, *et al.*, 2003), na qual gotículas oleosas nanométricas, apresentando revestimento polimérico, são formadas espontaneamente. Durante o preparo das formulações houve um controle de temperatura ajustado para 40 °C, utilizando-se, para isso, de um sistema de banho de aquecimento conectado a reatores camisados (jaqueta para tubo do tipo Falcon FP50 de fundo cônico) com agitação magnética a 250 rpm. Foram preparadas NC vazias, NC com ZnS₄Pc (NC/ZnS₄Pc), NC com AMB (NC/AMB) e NC mistas com a associação de ambas as substâncias (NC/ZnS₄Pc + AMB). As formulações foram iniciadas com o preparo da fase orgânica, totalizada por 15 mL de acetona, pela inclusão do copolímero PLGA 50:50 (0,75% m/v) e, atuando como tensoativo, a lecitina de alta pureza fosfatidilcolina de soja (1,75% m/v), previamente pesados e dissolvidos na fase mencionada e mantida a temperatura de 40 °C. Para as NC/ZnS₄Pc, a ZnS₄Pc foi previamente dissolvida no óleo de soja com a ajuda do banho ultrassônico completando sua solubilização pelas lavagens com a fase orgânica. O mesmo procedimento foi realizado para as NC/AMB, enquanto que, para as NC/ZnS₄Pc + AMB, a melhor

maneira de preparo para evitar perdas dos compostos foi com a AMB sendo solubilizada no óleo de soja e a ZnS₄Pc com a fase orgânica, sempre com o auxílio do banho ultrassônico por 10 min, para melhorar o processo de dissolução.

A fase aquosa, apresentando 30 mL de água, foi preparada pela adição do tensoativo Kolliphor P188 (1,25 % m/v) em água ultrapura, sob agitação magnética moderada e constante (250 rpm) a 40 °C e, após completa solubilização do mesmo, a fase orgânica foi gotejada (uma gota por segundo) sobre a fase aquosa ocasionando à formação das NC. Completado o processo de gotejamento, toda a fase orgânica e 20 mL da fase aquosa foram removidas pelo processo de evaporação, com a ajuda de um rotaevaporador – Buchi, sob pressão reduzida a 125 rpm, até um volume final de formulação de 10 mL. A Figura 7 representa, de maneira esquemática, as etapas do processo de produção das NC segundo o método acima descrito.

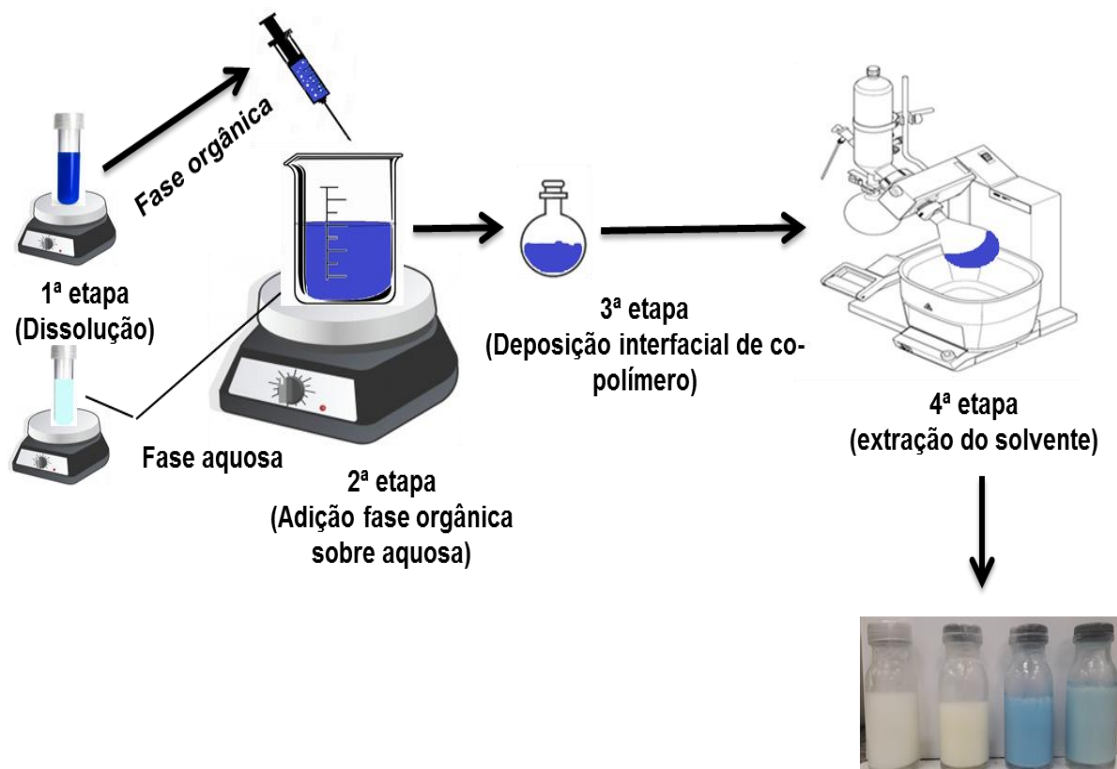


Figura 7. Método de deposição interfacial do polímero pré-formado descrito por Fessi *et al.* (1989) com adaptações.

4.2.2 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

4.2.2.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DAS PARTÍCULAS E ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE

O tamanho médio das nanocápsulas (diâmetro hidrodinâmico - d) e o índice de polidispersidade (Pdl) foram determinados tanto na presença quanto na ausência de AMB e ZnS4Pc por meio da técnica do Espalhamento Dinâmico de Luz (“*Dynamic Light Scattering*” - DLS). Para a realização das análises, foram respeitados os procedimentos operacionais padrões (POP) do equipamento em uso, Zetasizer® Nano ZS90 - *Malvern Instruments*, do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara- UNESP. O preparo das amostras para as análises em questão foi executado pela diluição de 20 μ L da formulação em 2 mL de água ultrapura- MiliQ (diluição 1:100). As análises foram conduzidas a 25 °C com um laser de 633 nm. As amostras ficaram contidas em uma cubeta de poliestireno com caminho óptico de 1,0 centímetro (cm).

4.2.2.2 MEDIDA DO POTENCIAL ZETA

O potencial zeta (ζ) das nanocápsulas, calculado pelo equipamento Zetasizer® Nano ZS90 - *Malvern Instruments* foi medido por mobilidade eletroforética. As análises foram realizadas com as amostras diluídas 1:100, a 25 °C diretamente em água ultra-pura.

4.2.2.3 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

Uma série de novas oportunidades e modalidades de observação sobre sistemas biológicos complexos foi aberta com o desenvolvimento da MFA que surgiu como uma das mais poderosas e versáteis técnicas devida a sua possibilidade de adquirir imagens morfológicas tridimensionais com resolução sub-nanométrica (RUGGERI *et al.*, 2019). Uma análise topográfica convencional é capaz de fornecer informações valiosas das características morfo-estruturais de amostras biológicas heterogêneas (RUGGERI *et al.*, 2019). A MFA progrediu para tornar-se uma ferramenta extremamente útil para o estudo da estrutura e propriedades de sistemas nanoestruturados, incluindo as nanopartículas (ADHIKARI *et al.* 2017). Entretanto, como toda técnica, apresenta vantagens e desvantagens. Assim, além do alto poder de resolução e abertura de novas oportunidades de observação, vigora também entre as vantagens a possibilidade de geração de imagens sob condições úmidas e sem pré-tratamento das amostras. Entre as desvantagens temos, por exemplo, as interações entre a ponta do *cantilever* do microscópio e a amostra, podendo causar distorções nas imagens e resolução máxima por volta de 2 nm no modo não-contato (DUBES *et al.*, 2003).

Sob temperatura ambiente e sem a necessidade de cobertura da amostra, foram adquiridas as imagens das formulações utilizando o equipamento “*Scanning Probe Microscope*” modelo SPM-9600, da Shimadzu e *software* SPM Online, do Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Departamento de Química da FFCLRP-USP. Uma gota (5,0 µL) das formulações NC/ZnS₄Pc e NC/ZnS₄Pc + AMB foi depositada em uma superfície de mica, depois espalhada e seca sob temperatura ambiente. Com um *cantilever* de 124 µm, as imagens foram obtidas pelo modo de contato intermitente

a uma frequência de ressonância operando entre 324-369 KHz, rigidez de 34-51 N/m e força constante. As imagens das formulações foram processadas usando o próprio *software* do equipamento.

4.2.3 DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Foram determinados, no estado estacionário, os espectros de absorção e emissão de fluorescência de ZnS₄Pc livre (5,0 μmol.L⁻¹) e nanoencapsulado (0,05 mg.mL⁻¹) como componente da caracterização espectroscópica a partir do espectrofotômetro GENESYS™ 10S UV-Vis (ThermoFisher Scientific) (Figura 8-A) e espectrofluorímetro RF 6000 – Shimadzu (Figura 8-B), respectivamente. Para os espectros de absorção foram utilizados cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico com duas faces foscas e duas transparentes, enquanto que para as análises de fluorescência, conquanto a cubeta também tenha sido de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico, esta apresentava os quatro lados transparentes, própria para esse tipo de análise. Ademais, no que tange a medida de fluorescência, estabeleceu-se um protocolo com excitação fixa em 640 nm, tempo de integração de 0,1 s, fendas de excitação e emissão de 3,0/3,0 nm respectivamente, e faixa leitura foi 650 a 800 nm.

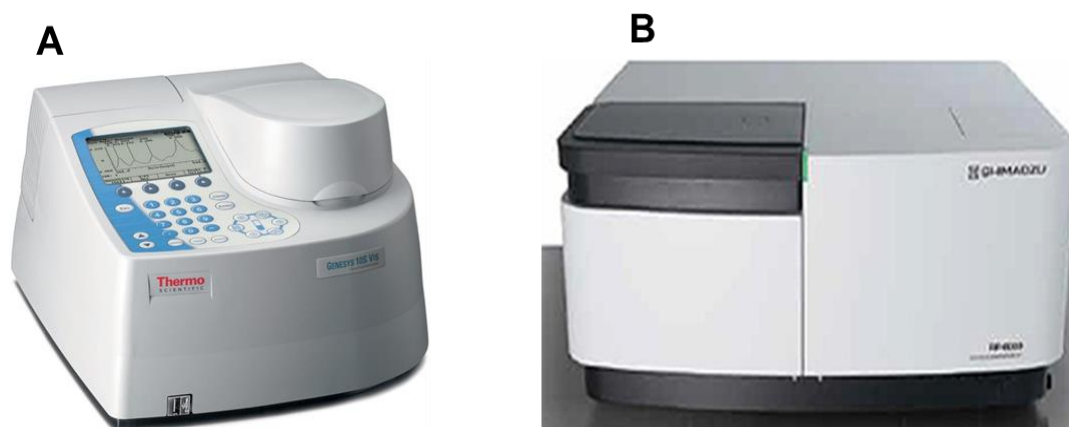


Figura 8. Espectrofotômetro GENESYS™ 10S UV-Vis- ThermoFisher Scientific e Espectrofluorímetro RF 6000 – Shimadzu.

4.2.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROANALÍTICO

A fim de possibilitar o cálculo posterior da quantificação e teor de encapsulação de ZnS4Pc e AMB na formulação, construiu-se, em DMSO, uma curva padrão correlacionando a máxima absorção e a concentração variando de 0,255 a 2,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,50 a 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZnS4Pc e AMB, respectivamente. Previamente a construção da curva, foram preparadas uma solução padrão (*sp*) de concentração 51,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZnS4Pc e 200,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para AMB. As curvas com as diferentes concentrações foram construídas pelo método de diluições sucessivas adicionando-se frações da *sp* na cubeta com micro-seringas analíticas (Hamilton Co.) de 10 a 50 μL para a obtenção das concentrações desejadas, avaliando-se, posteriormente, os parâmetros de Linearidade, Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).

A validação dos parâmetros, acima descritos, foi realizada conforme o estabelecido pela Conferência Internacional de Harmonização (*International Conference on Harmonisation, ICH*), para registro de produtos farmacêuticos, objetivando, em humanos, o seu uso, com base no guia de validação da ICH nomeado

“*Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*” Q2(R1) (ICH, 2005), que, semelhantemente, se apresenta como estabelecido pela “*United States Pharmacopeia USP 30 NF 25* (USP, 2007)” e por Siqueira-Moura e colaboradores (2010).

4.2.4.1 LINEARIDADE

A linearidade do método foi estabelecida construindo-se cinco curvas de calibração com sete pontos de concentrações diferentes variando de 0,255 a 2,04 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 0,50 a 10,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZnS4Pc e AMB, respectivamente, obedecendo a Lei de Lambert-Beer.

4.2.4.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

Foram estimados os Limites de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ) a partir da curva padrão de correlação. Os cálculos de LD e LQ foram realizados de acordo com as Equações 1 e 2, respectivamente:

$$\text{LD} = (\text{DP}/b) \times 3,3 \quad (1)$$

$$\text{LQ} = (\text{DP}/b) \times 10 \quad (2)$$

Em que, DP é o desvio padrão do intercepto com relação ao eixo dos Y e b o valor da inclinação da curva analítica

4.2.5 QUANTIFICAÇÃO E TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DOS ATIVOS NA FORMULAÇÃO

Para o cálculo da quantificação, as amostras das NC foram diluídas 25x, enquanto que, para teor de encapsulação em NC, as diluições empregadas no sobrenadante após a centrifugação, foram de 4x para as NC/ZnS₄Pc e 5,3x para NC/ZnS₄Pc + AMB, respectivamente. Para o cálculo dos dois parâmetros utilizou-se o método de espectroscopia de absorção na região do UV-Vis em um espectrofotômetro GENESYS™ 10S UV-Vis (ThermoFisher Scientific), valendo-se de uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico, contendo 2,0 mL de DMSO com as substâncias diluídas, abertura de feixe de 1,0 nm, velocidade de varredura 800 nm/min e medidas na faixa 300 a 800 nm para ZnS₄Pc e 300 a 470 nm para AMB.

O teor de encapsulação (T.E) dos ativos ZnS₄Pc e AMB foram calculados mediante a correlação entre a quantidade total do ativo presente na formulação (cálculo de quantificação) e a concentração dosada no sobrenadante, de acordo com a Equação 3 demonstrada a seguir:

$$\text{T.E. (\%)} = \frac{(\text{TPC} - \text{LPC})}{(\text{TPC})} \times 100 \quad (3)$$

Em que TPC representa a concentração total do ativo na formulação e LPC à concentração do ativo presente no sobrenadante da amostra, após submeter-se à centrifugação para total separação.

Para tanto, foi utilizada uma microcentrífuga modelo Heraeus™ Fresco™ 17-*Thermo Fisher Scientific* e um microtubo para centrifugação Amicon® Ultra- 0,5 mL com filtro 30 kDa para reter as nanocápsulas, e permitir a passagem da fase aquosa externa para além do filtro, resgatando-a como sobrenadante no fundo do microtubo.

A centrifugação ocorreu por 60 min a 13.000G (10.774 rpm) e 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro, tendo, como base para os cálculos, os comprimentos de onda adotados nas curvas analíticas. Abaixo, a Figura 9 descreve, esquematicamente, as etapas realizadas para o experimento de teor de encapsulação.



Figura 9. Esquema representativo das etapas do experimento do teor de encapsulação

4.2.6 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM RESAZURINA: PADRONIZAÇÃO DO MÉTODO DE VIABILIDADE CELULAR

Foi realizado um ensaio preliminar para determinar o melhor tempo de incubação para as linhagens celulares de *Candida albicans* ATCC® 90028™ antes dos ensaios de atividade fotodinâmica antimicrobiana. O ensaio foi realizado de acordo com o descrito por Rezende *et al* (2019).

As células de *Candida albicans* ATCC® 90028™ foram inoculadas em caldo Sabouraud dextrosado e incubadas por 18 h a 37 °C. Após esse período, foram transferidas para tubo falcon e centrifugadas para descarte do sobrenadante. As células foram ressuspensas com solução de PBS pH 7,4 e contadas em microscópio óptico com auxílio de uma câmara de Neubauer. Foi construída uma solução padrão fúngica de 3×10^6 células.mL⁻¹ em PBS pH 7,4 com resazurina diluída para 2,5 µg.mL⁻¹. Alíquotas de 500 µL foram adicionadas em placas de microtitulação

de 24 poços e incubadas a 37 °C. Leituras por espectroscopia de absorção foram realizadas no tempo 0, 24 e 48 h.

4.2.7 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS NIH/3T3 UTILIZANDO RESAZURINA

O ensaio de citotoxicidade, retratado pela viabilidade celular, representa um requisito fundamental para avaliação biológica de sistemas farmacêuticos, utilizando-se, para isso, cultura de células de mamífero *in vitro* para avaliar a saúde celular das mesmas (LIU *et al.*, 2018). Caracteriza-se por ser um modo de determinar se um dado composto contém substâncias com potencial biologicamente tóxicas ou prejudiciais à célula (LIU *et al.*, 2018).

Com o intuito de avaliar a citotoxicidade da NC mistas, ensaios de viabilidade celular foram realizados utilizando-se a resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido, Sigma-Aldrich Co., MO, EUA). A resazurina, um corante naturalmente azul, possui uma banda de absorção máxima em 600 nm e, na presença de células vivas, é internalizada pelas mesmas sofrendo metabolização reduzindo-se à resorufina de coloração rosa, cuja banda de máxima absorção se encontra em 570 nm (JAYME *et al.*, 2017) e, após excitada, emite luz no comprimento de onda de 590 nm (XU *et al.*, 2015), de modo que pode ser quantificada tanto por espectroscopia de absorção quanto por fluorescência. Assim, de posse dessas informações, empregou-se a espectroscopia de absorção para quantificar o número de células viáveis após a incubação das células com as NC Mistas e, para tal, foi empregado o leitor de microplacas Tecan Safire II (Tecan Group, Grödig, Áustria).

A Linhagem comercial de fibroblasto murino (NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658™ foi utilizada como modelo biológico. Tal linhagem foi cultivada em uma estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. A princípio, o cultivo ocorreu até que fosse atingido o estágio de confluência e, após isso alcançado, as células foram retiradas das garrafas de cultura celular com auxílio de tripsina e centrifugadas a 2500 rpm por 10 min. Posteriormente, as células foram ressuspensas em meio DMEN suplementando com Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%. Com o auxílio de uma Câmara de Neubauer houve a contagem do número de células vivas valendo-se, para isso, de 100 µL da suspensão celular na qual foram adicionados mais 300 µL de solução Azul de Tripán 0,4%, como descrito por Freshney (1994). A contagem ocorreu com a ajuda do microscópio óptico Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) no campo claro e lente objetiva de aumento de 10x, em que apenas as células vivas foram contadas, isto é, aquelas que não foram coradas de azul. Uma concentração celular correspondente a 5×10^3 células por poço foi padronizada para os ensaios de viabilidade celular em vitro, utilizando-se placas de microtitulação de 96 poços dentro das quais as células foram semeadas com meio DMEN suplementado a 10% SFB e incubadas por 24 h. Após este tempo de incubação, o meio foi retirado e adicionou-se as NC Mistas diluídas a 1%, 2,5%, 5%, 10% e 15% (v/v) em meio DMEN suplementado com 3% de SFB. Como controle positivo de crescimento celular, 16 poços da placa foram destinados para semear as células sadias em meio DMEN sem qualquer adição de NCs, bem como também destinou-se outros 16 poços para a incubação das células junto as NC vazias diluídas a 15% (v/v) para avaliação da citotoxicidade do sistema nanoestruturado isento dos ativos. Protegidas da luz, as células foram incubadas por um período de 4 h. Alcançada as 4 h, o meio foi retirado das placas e substituído por meio DMEN suplementado a 10% com SFB seguida de uma incubação por mais 24 h. Assim,

transcorrido esse período, realizou-se o ensaio de viabilidade celular propriamente dito com resazurina conforme protocolo descrito por Jayme e colaboradores (2017). Como descrito na seção 4.2.6, padronizou-se o melhor tempo de incubação da resazurina junto as células NIH/3T3 em uma placa de microtitulação de 24 poços conforme descrito por Rezende *et al* (2019). As células, previamente contadas, foram palanqueadas na concentração de 5×10^3 células por poço em meio DMEN com SFB a 10%. Após 24 h de incubação, o meio foi retirado e adicionou-se meio DMEN sem vermelho de fenol com resazurina ($25 \mu\text{g.mL}^{-1}$) diluída a 10%. Após 3, 4 e 5 h foram retiradas alíquotas do sobrenadante dos poços e realizou-se a leitura no espectrofotômetro por espectroscopia de absorção de modo a determinar o melhor tempo de incubação para a internalização e metabolização da resazurina pelas células NIH/3T3. Padronizou-se o tempo de incubação para 4 h. Assim, decorridas 24 h do tratamento das células com a formulação das NC mistas, foi adicionado aos poços da placa o meio DMEN com resazurina a 10% e, subsequentemente, incubou-se a placa por 4 h, realizando-se, em seguida, as leituras espectrofotométricas de absorbância em 570 nm e 600 nm. A apresentação dos resultados se deu por percentagem em relação ao controle segundo consta na Equação 4:

$$(\%) \text{ células viáveis} = (\text{D.O amostra} / \text{D.O controle}) \times 100 \quad (4)$$

4.2.8 ENSAIO DE ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICRIANA (FOTOINATIVAÇÃO) E MFC

O ensaio de fotoativação ou atividade fotodinâmica foi realizado com células planctônicas em uma placa de microtitulação de 24 poços segundo adaptação do

protocolo descrito por Ribeiro *et al* (2012). Foram utilizadas células da American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD) de *Candida albicans* ATCC® 90028™ mantidas em meio Ágar Sabouraud dextrosado em colaboração com Laboratório de Biotecnologia- BIOTECFAR da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara.

Antes do início do experimento, as células foram inoculadas em meio caldo Sabouraud e mantidas por 18 h em uma estufa a 37 °C. Transcorrido este tempo, todo o conteúdo do tubo de ensaio foi transferido para tubo cônico e levado para centrifugação por 10 min a 7000 rpm. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas com 5 mL de solução PBS pH 7,4. Com o auxílio de uma câmara de Neubauer e microscópio óptico foi realizada a contagem das células, e preparou-se uma solução fúngica padrão em PBS pH 7,4 na concentração 3×10^6 células/mL, de modo que, no final do experimento, após plaqueamento, cada poço da placa conteria $1,5 \times 10^6$ células com adição de 500 µL da solução.

Da solução fúngica padrão foram transferidos 8,0 mL para 2 tubos cônicos e seguiu-se com a centrifugação dos mesmos por 10 min a 7000 rpm, descartando-se o sobrenadante ao final. Em seguida, ambos os tubos tiveram as células leveduriformes ressuspensas com 8,0 mL das NC Mistas diluídas a 1% e 5% (v/v) em PBS pH 7,4, conferindo uma concentração de ZnS4Pc de $0,144 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,720 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e para AMB de $0,42 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $2,11 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

As leveduras permaneceram em contato com a NC mistas diluídas por 30 min no escuro, prosseguindo-se, após este período, com uma nova centrifugação por 10 min a 7000 rpm e descarte do sobrenadante. Finalmente, as células foram ressuspensas com 8,0 mL de PBS pH 7,4, e alíquotas de 500 µL foram transferidas para as placas de 24 poços. Além disso, alíquotas de 500 µL da solução fúngica

padrão em PBS pH 7,4 (sem tratamento com as NC Mistas) também foram transferidas para as placas de modo a assumirem os papéis tanto do controle positivo de crescimento, quanto do controle relacionado apenas as doses de luz empregadas. Três placas foram montadas sendo que uma delas permaneceu no escuro como controle, e as outras duas sofreram irradiação por LED em 660 nm com doses de luz de 12 J/cm² e 25 J/cm². Para a irradiação foram utilizadas lâmpadas do tipo LED de 660 nm com intensidade de luz 12 mW/cm² empregando-se o equipamento Biotable (MMOptics, São carlos/SP). Após transcorrido o tempo de irradiação, foi realizado o experimento de Concentração Fungicida Mínima (MFC) das 3 placas para avaliar se o efeito conseguido pelo tratamento era fungicida ou fungistático. Para isso, utilizou-se palitos de dente estéreis em que a ponta dos mesmos entraram em contato com os poços das placas, sendo, em seguida, colocados em contato com meio ágar Sabouraud contido em placas de petri e incubados. Por último, a partir de uma solução de resazurina a 65 µg.mL⁻¹ em PBS pH 7,4, adicionou-se 20 µL da mesma sobre os poços da placa de modo que a concentração final de resazurina por poço foi igual 2,5 µg.mL⁻¹ semelhante ao do ensaio de citotoxicidade. As placas de microtitulação juntamente com as placas de MFC foram incubadas a 37 °C por 48 h. Findado esse período, as placas de MFC foram analisadas visualmente observando se houve crescimento de colônias, enquanto as placas de 24 poços foram lidas no leitor de microplacas Tecan Safire II (Tecan Group, Grödig, Áustria) por absorvância em 600 nm e 570 nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DAS NANOCÁPSULAS

5.1.1 DETERMINAÇÃO DO TAMANHO, ÍNDICE DE POLIDISPERSIDADE E POTENCIAL ZETA DAS NANOCÁPSULAS

Estudos de estabilidade por meio da caracterização físico-química constataram a instabilidade das formulações de NC/ZnS4Pc (agregação das nanopartículas) em temperatura ambiente (25°C) após 70 dias, razão pela qual as formulações foram mantidas no refrigerador a 7 °C, afim de se manterem estáveis. As formulações estão demonstradas na Figura.10, e todas apresentaram-se com uma coloração opaca, leitosa e não translúcida, de modo que as NC Vazias eram brancas, as NC/AMB amarelas, as NC/ZnS4Pc azul escuro e as NC/ZnS4Pc + AMB com uma coloração azul claro. Todas as formulações passaram por análises físico-químicas acompanhadas do desvio-padrão.

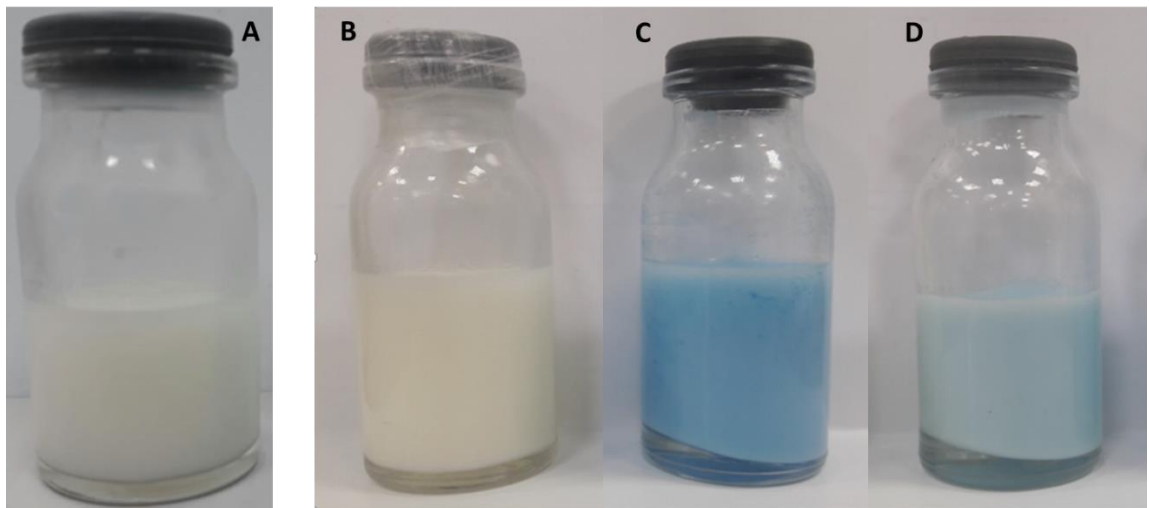


Figura 10. Fotografias das nanocápsulas poliméricas sendo NC vazias (A), NC/AMB (B), NC/ZnS4Pc (C) e NC/ZnS4Pc + AMB (D)

Com 87 dias de acompanhamento, as NC vazias (NC/Vazias) apresentaram valores médios de d , Pdl e ζ de $174,6 \pm 2,9$ nm, $0,245 \pm 0,02$ e $-20,49 \pm 4,26$ mV, respectivamente. Quanto aos valores de d e Pdl , foram os menores conseguidos

como é demonstrado pela Figura 11. Para as NC/ZnS4Pc, com 96 dias de acompanhamento, tais informações revelaram-se $252,9 \pm 16,2$ nm, $0,465 \pm 0,07$ e $-24,89 \pm 7,09$ mV, respectivamente (Figura 12). Foram obtidos $310,9 \pm 75,6$ nm, $0,447 \pm 0,04$ e $-28,19 \pm 9,02$ mV para as NC/AMB com, também, 96 dias (Figura 13). Por fim, para as NC mistas, acompanhadas por 158 dias, observamos d, Pdl e ζ de $253,81 \pm 17,3$ nm, $0,364 \pm 0,01$ e $-31,03 \pm 5,54$ mV, respectivamente, (Figura 14).

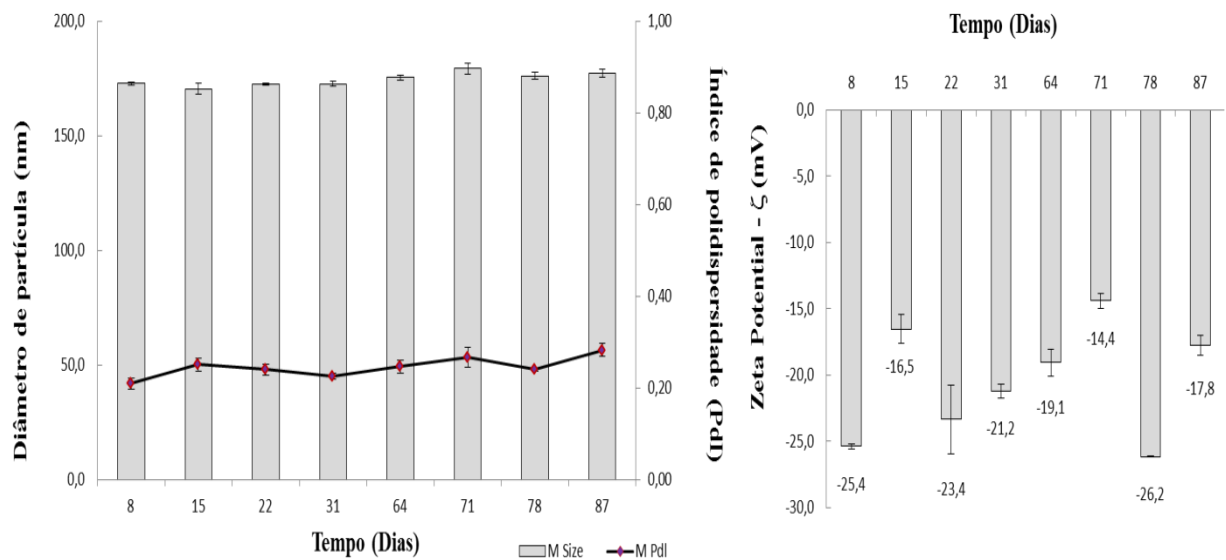


Figura 11. Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/Vazia

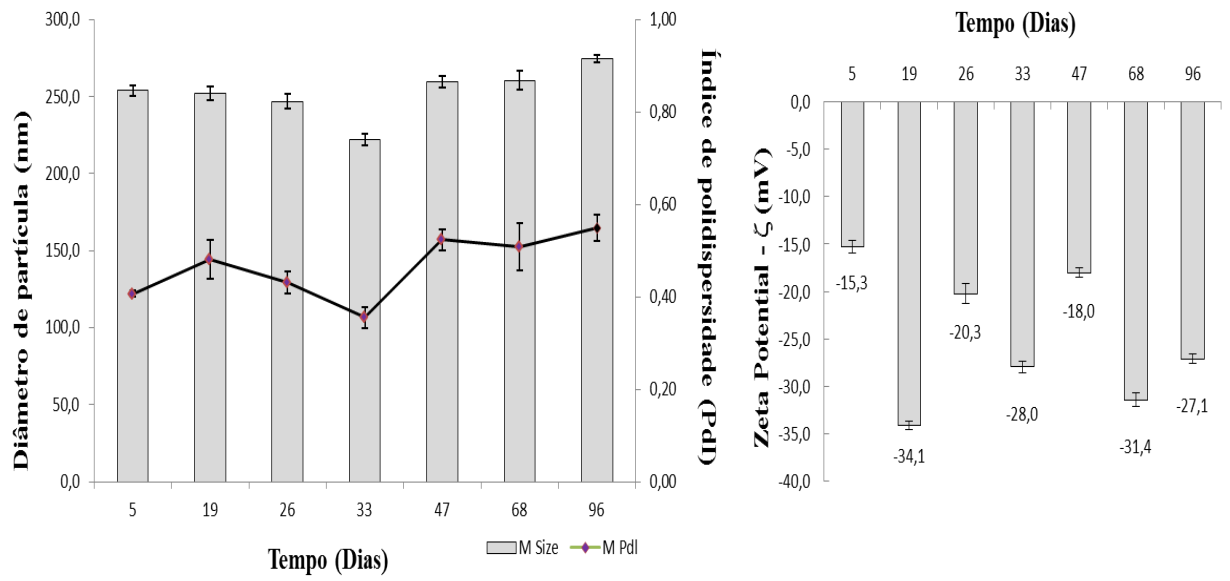


Figura 12. Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/ZnS4Pc.

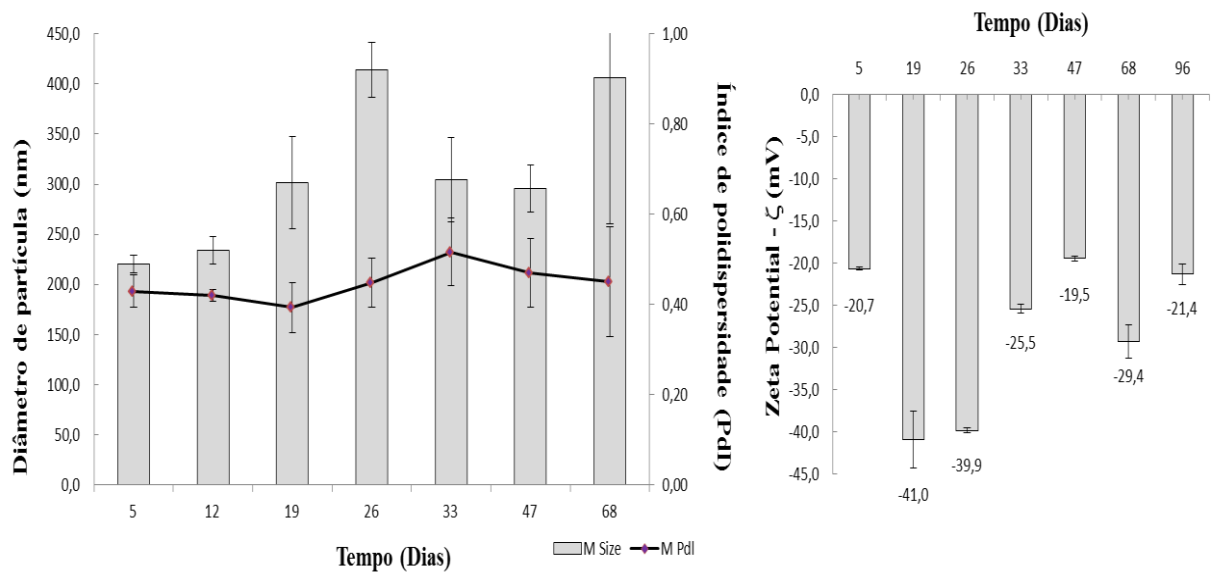


Figura 13. Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/AMB.

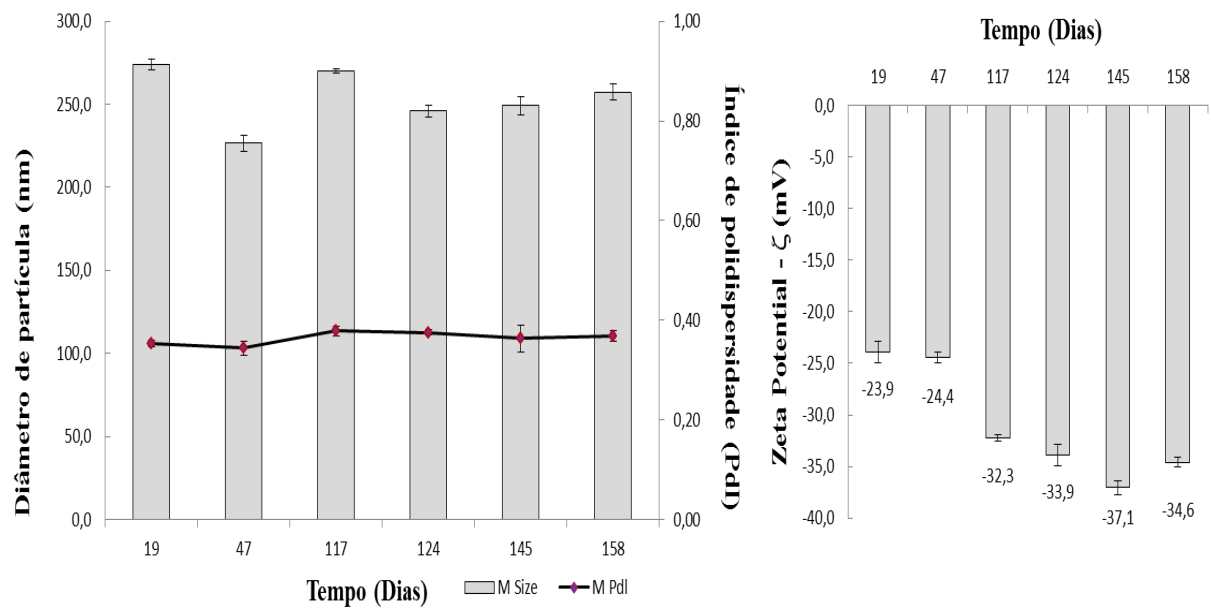


Figura 14. Análises de Diâmetro de partícula, Pdl e potencial zeta de NC/ZnS4Pc + AMB.

O tamanho médio das partículas ou a distribuição de tamanhos é, para muitas aplicações no campo de materiais, uma característica fundamentalmente importante tanto na área da indústria farmacêutica como cosmética (CHAMIEH *et al.*, 2015). É um pré-requisito antes que possa ser usado em testes toxicológicos; em sistemas vivos, não se deve desconsiderar o impacto que as nanopartículas podem gerar, pois o potencial de toxicidade das mesmas está diretamente relacionado ao material com que são produzidas, seu revestimento, porosidade, cristalinidade, rugosidade, heterogeneidade, bem como seu tamanho e sua forma (LANGEVIN, *et al.*, 2018). Na prática laboratorial de bancada não é possível desenvolver um sistema onde todas as partículas apresentem a mesma distribuição de tamanho, e temos no valor do Pdl a medida dessa variável, em que quanto menor seu valor maior será a quantidade de nanopartículas apresentando tamanhos semelhantes (sistema monodisperso). Não menos importante é a medida do potencial zeta que também se mostra importante e fundamental. O potencial Zeta da amostra determina se as partículas, dentro de uma amostra, tendem a flocular ou não, e diz-se de uma formulação estável aquela que

apresenta capacidade de se manter inalterada ao longo do tempo e sob condições pré-determinadas; uma desestabilização física da formulação tem como causa a agregação das nanopartículas, o que pode ser evitado em se obtendo altos valores de carga de superfície ou altos valores de potencial Zeta (MARIN *et al.*, 2017), pois haverá repulsão eletrostática entre elas mantendo-as em movimento browniano, além de impedir a agregação em função das colisões ocasionais (SCHAFFAZICK *et al.*, 2003). Tais valores são representados por uma carga elétrica, em módulo, de 30 mV, isto é, as nanopartículas cujos valores de potencial zeta são superiores +30 mV ou - 30 mV são consideradas como sistemas coloidais estáveis (RAVAL *et al.*, 2019) pelas razões anteriormente citadas. Como demonstrado nas Figuras 11 a 14, os valores do diâmetro das NC mantiveram-se entre 174,6 a 310,9 nm, o que revela estar de acordo com o que se espera para sistemas de veiculação de fármacos construídos por meio do método de deposição interfacial de polímeros pré-formados cujo tamanho das partículas varia entre 250 a 500 nm (MORA-HUERTAS *et al.*, 2010). O Pdl, por sua vez, variou entre 0,24 a 0,47 e, finalmente, os valores de ζ oscilaram de -20,49 a -31,03 mV, próximo a região de estabilidade.

As NC/vazias, com relação ao tamanho e o Pdl, foram as que apresentaram não só os menores valores, bem como mostraram manter-se praticamente constantes durante o tempo (Figura 11 e Tabela 1 em anexos). Tal comportamento pode ser explicado pela ausência de armazenamento de ativos, possibilitando uma formação mais compacta e uniforme.

As NC/ZnS4Pc, semelhantemente as NC/vazias, também demonstraram nanocápsulas com tamanhos satisfatórios, embora os valores de Pdl apresentaram maior oscilação (Figura 12 e Tabela 2 em apêndices).

Para as NC/AMB também é possível notar oscilação em seu tamanho, embora o valor médio manteve-se abaixo dos 500 nm. Os valores de Pdl não sofreram grandes oscilações, embora elas existem (Figura 13 e Tabela 3 em apêndices).

Para as NC mistas, não houve um aumento considerável do tamanho médio das NC em comparação às NC/ZnS₄Pc, mas quando comparadas às NC/AMB, foi menor. O Pdl médio apresentou-se menor que os apresentados pelas NC com os ativos isolados, conquanto todos foram superiores a 0,30, denotando um sistema polidisperso visto que os mesmos se caracterizam por Pdl superior a 0,1 (RAVAL *et al.*, 2019) (Figura 14 e Tabela 4 em anexos). Entretanto, somente com distribuições mais amplas em que o Pdl > 0,5 torna-se prudente não confiar no tamanho médio das partículas (INSTRUMENTS, 2004). Assim, com os valores experimentais obtidos de Pdl inferiores a 0,5, é possível inferir a confiabilidade dos tamanhos médios obtidos.

Os valores de potencial Zeta para todas as nanocápsulas mantiveram-se entre -20 mV a -30 mV, próximo, portanto, do ideal para manutenção da estabilidade da formulação (a partir de 30 mV em módulo). O potencial zeta negativo pode ser explicado pela presença dos grupos carboxílicos presentes no polímero PLGA (RAMALHO *et al.*, 2018), podendo-se concluir, a partir disso, que os valores apresentados pelas NC são coerentes com o que se esperava.

5.1.2 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

A força de interação entre a superfície da amostra e a ponta do *cantilever* do Microscópio de Força Atômica faz deste uma poderosa ferramenta de investigação da morfologia e estrutura superficial de materiais, apresentando, como desejada

vantagem, altíssima resolução de imagem na ordem de um nanômetro (HU CHUANLIN *et al.*, 2018).

A Figura 15 revela uma análise tridimensional de NC/ZnS₄Pc e de NC mistas em que é possível visualizar um formato esférico nas nanocápsulas, bem como se demonstra partículas com tamanhos semelhantes. A Figura 16 mostra o perfil topográfico e mostra os cálculos, obtidos pelo software, do diâmetro das NC.

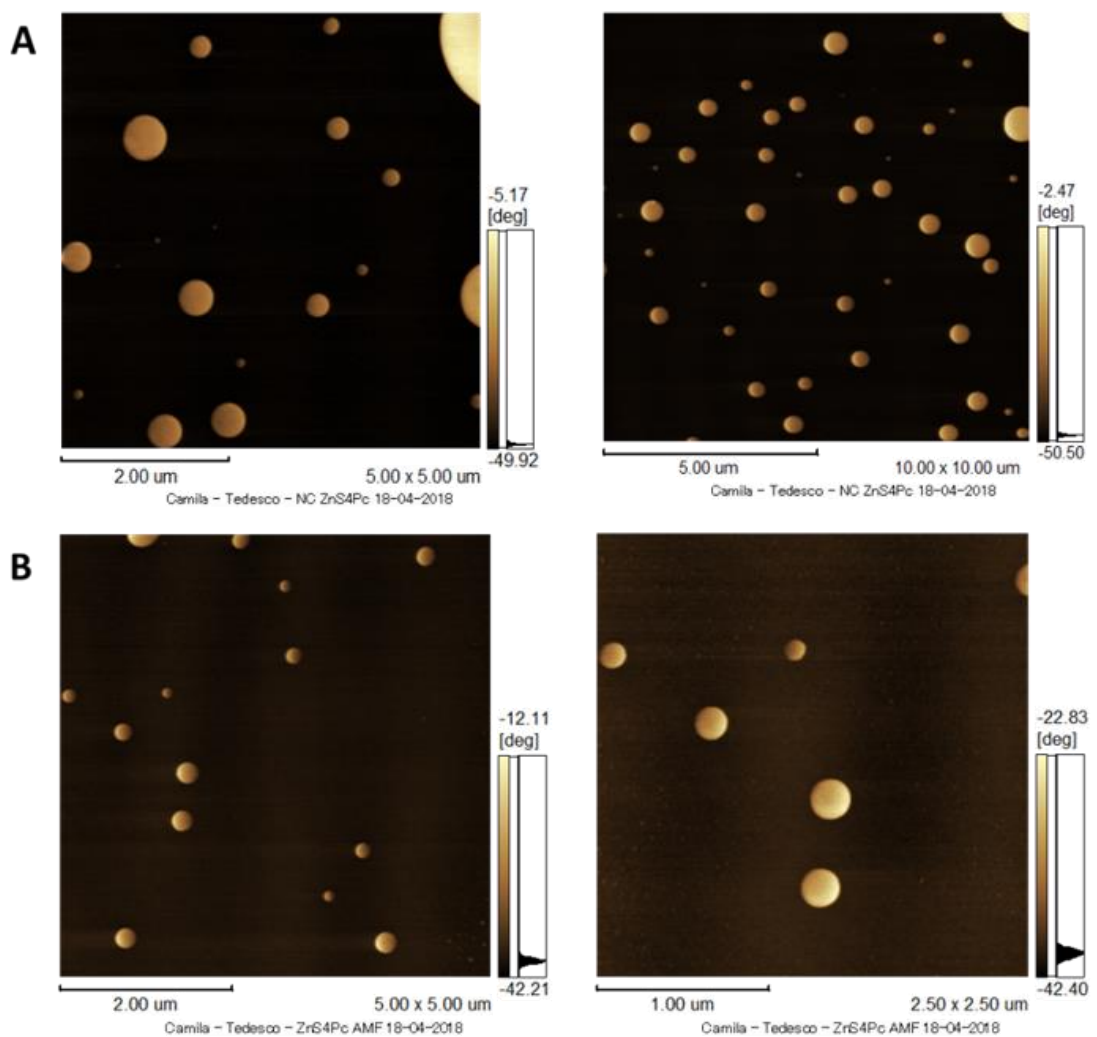


Figura 15. Fotomicrografias tridimensionais obtidas das formulações NC/ZnS₄Pc (A) e NC/ZnS₄Pc + AMB (B) por Microscopia de Força Atômica.

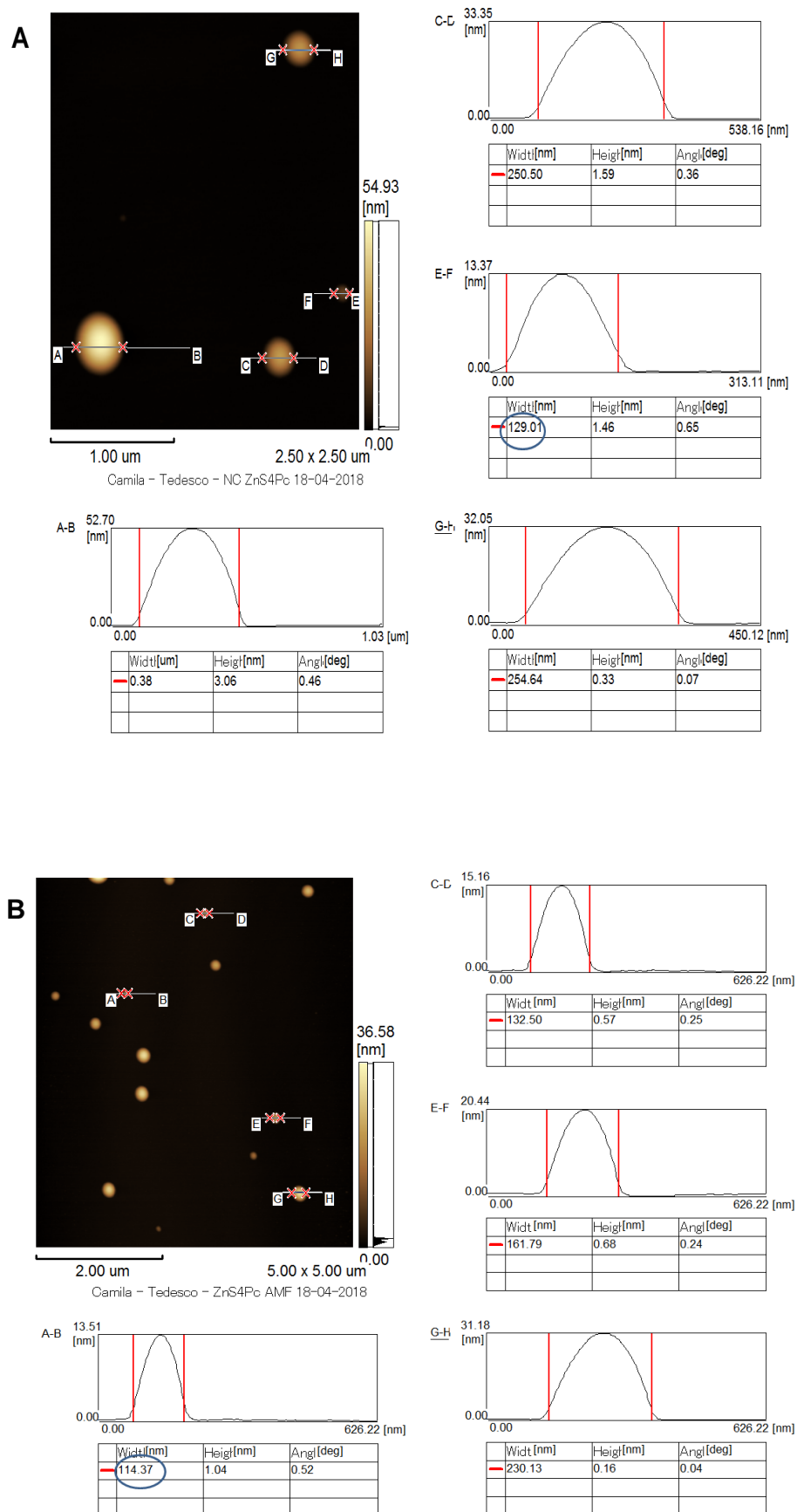


Figura 16. Fotomicrografia tridimensional e perfil topográfico de NC/ZnS₄Pc (A) e NC/ZnS₄Pc + AMB (B) com medidas de diâmetro e altura provenientes da análise do software.

Como demonstrado na Figura 15-A, visualmente foi possível perceber que as NC/ZnS₄Pc apresentaram um formato esférico e sem muita variação de tamanho. Em contrapartida, na Figura 16-A, com os cálculos do software, houve uma variabilidade mais acentuada no tamanho das nanopartículas para as NC/ZnS₄Pc, corroborando com os valores de Pdl de 0,465 para as mesmas pela técnica do DLS. Da mesma forma, a Figura 15-B revela, para as NC mistas, pouca variação de tamanho, embora a Figura 16-B denota variabilidade no tamanho de tais nanocápsulas. Entretanto, os valores do tamanho médio por MFA e DLS mostraram-se muito próximos, porém ligeiramente menores por MFA, cuja razão se explica pelo fato de que a técnica do DLS mede o diâmetro hidrodinâmico da partícula, isto é, considera as moléculas de água e eletrólitos presentes na superfície da partícula. Para as análises de MFA, a amostra é previamente seca desconsiderando a presença das moléculas de água que pudessem estar presentes na amostra, o que, em termos práticos, contribui para a diminuição do diâmetro das partículas.

5.2 DETERMINAÇÃO DOS ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA UV/VIS NO ESTADO ESTACIONÁRIO

Para a determinação do espectro de absorção de AMB livre, de absorção e emissão de ZnS₄Pc livre e associados em nanocápsulas, foram realizados os estudos de espectroscopia no estado estacionário. Os espectros de absorção estão demonstrados na Figura 17. Analisando os espectros conseguimos notar as características próprias de cada composto. Na Figura 17-A, referente a ZnS₄Pc, notamos duas regiões de absorção distintas em que uma está localizada na região do ultravioleta (100 a 400 nm) denominada banda Soret, enquanto a outra se

caracteriza por um conjunto de bandas localizadas na região do vermelho (620 a 750 nm) cujo comprimento de onda de maior absorção está em 672 nm e se denominam como bandas Q. A Figura 17-B, por sua vez, refere-se a AMB e nela notamos que há apenas absorção na região do ultravioleta caracterizada pela formação de um conjunto de quatro bandas, e cujo comprimento de maior absorção está em 416 nm.

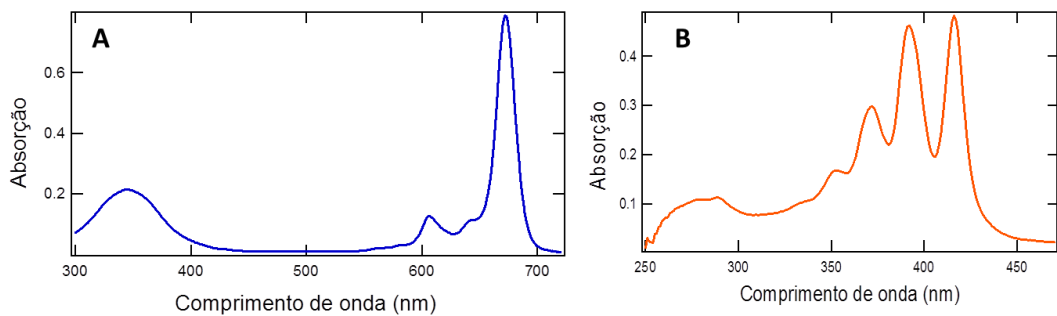


Figura 17. Curva de espectro de absorção: de ZnS₄Pc livre (A) e AMB livre (B) em Dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 1,275 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e 6 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Em seguida são apresentadas as curvas de emissão de ZnS₄Pc livre e nanoencapsulada isoladamente e em associação com AMB (Figura 18). Com o intuito de uma melhor visualização e apresentação dos dados, a curva de emissão de fluorescência foi normalizada percebendo-se, nitidamente, uma sobreposição das curvas de emissão, sugerindo-se inalteradas as características fotofísicas no estado estacionário de ZnS₄Pc encapsulada isoladamente e associada a AMB em relação a ZnS₄Pc na forma livre.

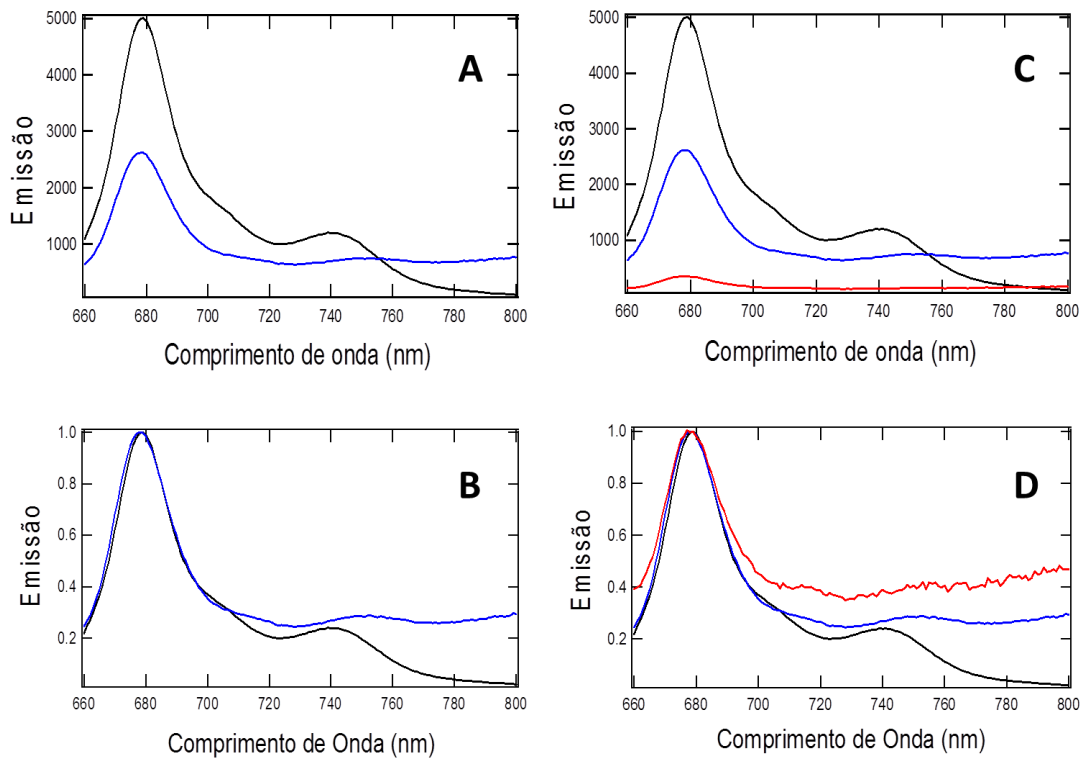


Figura 18. Curva de espectro de emissão: (A) ZnS₄Pc livre em acetonitrila (ACN) (—) e ZnS₄Pc encapsulada (NC/ZnS₄Pc) em H₂O (—); (C) ZnS₄Pc livre em ACN (—), NC/ZnS₄Pc em H₂O (—) e NC/ZnS₄Pc + AMB em H₂O (—). Os gráficos B e D representam as curvas normalizadas de A e C, respectivamente.

Como foi possível observar nos gráficos que compõe a Figura 18, não houve deslocamento da banda espectral de emissão de fluorescência de NC/ZnS₄Pc e NC/ZnS₄Pc + AMB em relação a ZnS₄Pc livre, mantendo o mesmo perfil de emissão máxima entre 678-679 nm para os dois ambientes químicos distintos. Temos uma banda espectral de emissão de 678 nm para NC/ZnS₄Pc e NC/ZnS₄Pc + AMB e 679 nm para ZnS₄Pc livre, ambas advindas de uma excitação em 640 nm. Tal fato mostra-se importante, pois sugere que não houve reação do ativo com os componentes do sistema nanoestruturado que pudessem alterar a banda de emissão. Ademais, a característica de apresentar melhor excitação em 640 nm é concordante com as propriedades desejáveis de alta absorção na região da cor vermelha do espectro eletromagnético visível, onde há maior penetração tecidual da luz

5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO ESPECTROANALÍTICO

5.3.1 LINEARIDADE

A Linearidade de um procedimento analítico diz respeito à capacidade, dentro de um determinado intervalo, de obter resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito presente na amostra (ICH, 2005), isto é, atribui confiabilidade de que os espectros de absorção ou emissão são de fato diretamente proporcionais à concentração do analito. Com base na Figura 19 foi possível observar um coeficiente de determinação (R^2) e coeficiente de correlação (R), para a curva analítica de ZnS₄Pc, de 0,9999, enquanto que para a curva analítica de AMB, um R^2 e R de 0,9994 e 0,9996 respectivamente. Tais valores corroboram com a afirmação da presença de linearidade para ambas as curvas, permitindo, assim, quantificar seguramente os ativos presentes nos sistemas nanoestruturados.

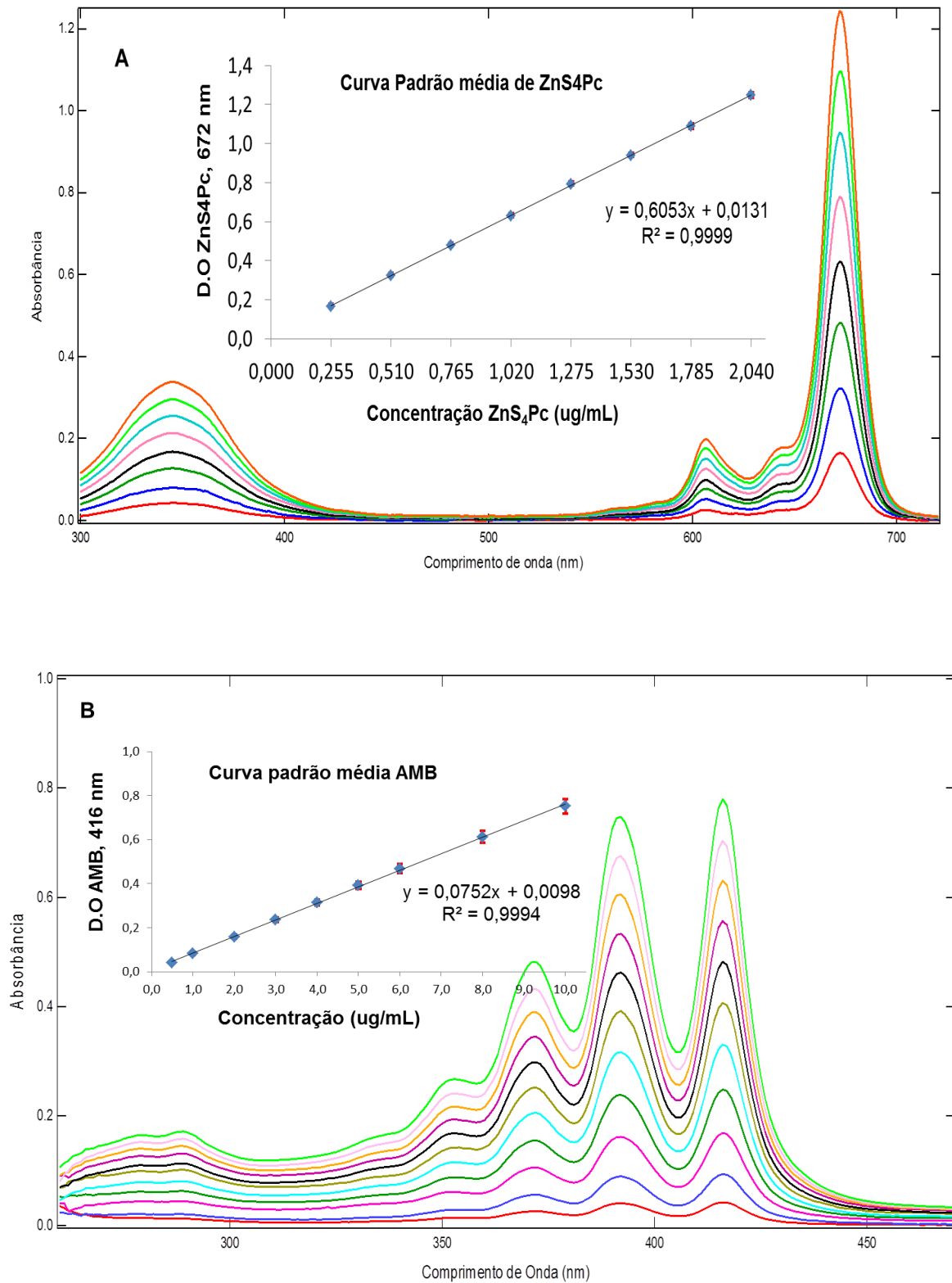


Figura 19. Curva de espectro de absorção de ZnS₄Pc livre em 672 nm (A) correlacionando a máxima absorção e a concentração em DMSO variando de 0,255 – 2,040 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com equação da reta $y = 0,6053x + 0,0131$, $R = 0,9999$, e curva de espectro de absorção de AMB livre em 416 nm (B) correlacionando a máxima absorção e a concentração em DMSO variando de 0,5 – 10,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ com equação da reta $y = 0,0752x + 0,0098$, $R = 0,9996$.

5.3.2 LIMITE DE DETECÇÃO (LD) E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LQ)

A espectroscopia de absorção demonstrou ser sensível para quantificação dos compostos, com LD de $0,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ de $0,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZnS₄Pc, ao passo que para AMB os valores de LD foram de $0,15 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e LQ de $0,45 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os LD e LQ para ZnS₄Pc e AMB demonstraram uma alta sensibilidade e possibilidade real de quantificar os ativos presentes na formulação. Como já foi relatado, as NC foram desenvolvidas a uma concentração teórica de $0,05 \mu\text{g.mL}^{-1}$, isto é, $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que é aproximadamente quinhentas e cinquenta e cinco vezes mais concentrado do que o mínimo quantificável de $0,09 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZnS₄Pc e cento e onze vezes mais concentrado do que o mínimo quantificável de $0,45 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para AMB. Assim, temos com esses dados uma boa margem de segurança a fim de quantificar as formulações preparadas, de modo a possibilitar, por conseguinte, a verificação do rendimento de encapsulação em uma etapa subsequente.

5.4 QUANTIFICAÇÃO E TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DOS ATIVOS NA FORMULAÇÃO

Como descrito na seção 5.3.1, foi construída uma curva analítica com o intuito de quantificar os ativos presentes nas formulações. As Equações 5 e 6, provenientes da curva padrão de ZnS₄Pc e AMB, respectivamente, foram utilizadas para a quantificação das mesmas:

$$\text{Absorbância} = 0,6053 \times [\text{ZnS}_4\text{Pc em } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0,0131 \quad (5)$$

$$\text{Absorbância} = 0,0752 \times [\text{AMB em } \mu\text{g.mL}^{-1}] + 0,0098 \quad (6)$$

Na Tabela 5 foram relacionados os dados dessa medida para as NC com as moléculas isoladas (NC/ZnS₄Pc e NC/AMB), enquanto que encontramos na Tabela 6 aqueles relacionados com as NC mistas. Todos os experimentos foram realizados em triplicata (Figuras 20 e 21) determinando-se a média dos valores com um intervalo de confiança (IC) de 95%.

Tabela 5. Quantificação dos ativos nas NC/ZnS₄PC e NC/AMB com IC de 95%

Presença dos ativos nas formulações					
	Quantificação (µg/mL)				Quantificação em %
	1	2	3	Média	
NC/ZnS ₄ Pc	21,27	20,81	21,02	21,03 ± 0,08	43,81
NC/AMB	41,62	39,96	39,96	40,51 ± 0,03	75,01

Tabela 6. Quantificação dos ativos nas NC/ZnS₄PC + AMB com IC de 95%

Presença dos ativos nas formulações					
	Quantificação (µg/mL)				Quantificação em %
	1	2	3	Média	
ZnS ₄ Pc	13,63	13,67	15,94	14,41 ± 0,05	30,66
AMB	35,31	35,64	35,64	35,53 ± 0,07	67,68

Em se tratando da quantificação das formulações com as moléculas isoladas, pudemos observar, para as NC/ZnS₄Pc, uma concentração média de ZnS₄Pc de 21,03 µg.mL⁻¹, o que representa um teor de quantificação, em porcentagem, de 43,81% em relação à concentração teórica (50 µg.mL⁻¹). Quando o olhar é voltado

para as NC/AMB, notamos uma concentração média de $40,51 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e teor na casa dos 75,01%, já que advém, também, de uma concentração teórica de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para as NC mistas (NC/ $\text{ZnS}_4\text{Pc} + \text{AMB}$), alcançamos uma concentração média de $14,41 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para ZnS_4Pc e $35,53 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para AMB, traduzindo-se em um teor de 30,66% e 67,68 % para ZnS_4Pc e AMB, respectivamente.

Com o desfecho dos resultados, observamos uma diminuição do teor de ZnS_4Pc e AMB nas NC mistas em relação às NC isoladas, o que pode ser explicado pela competição existente entre as 2 moléculas em ocupar a mesma formulação.

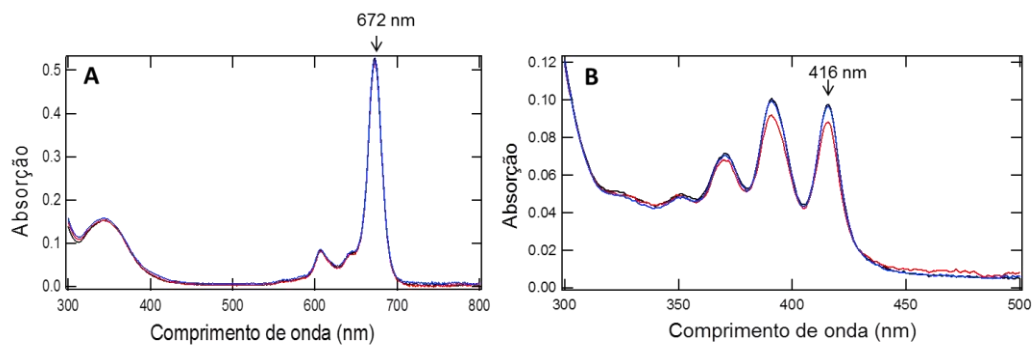


Figura 20. Curva representativa da quantificação em triplicata de ZnS_4Pc e AMB para NC/ ZnS_4Pc (A) e NC/AMB (B), respectivamente. Replicata 1 (■), replicata 2 (■), replicata 3 (■).

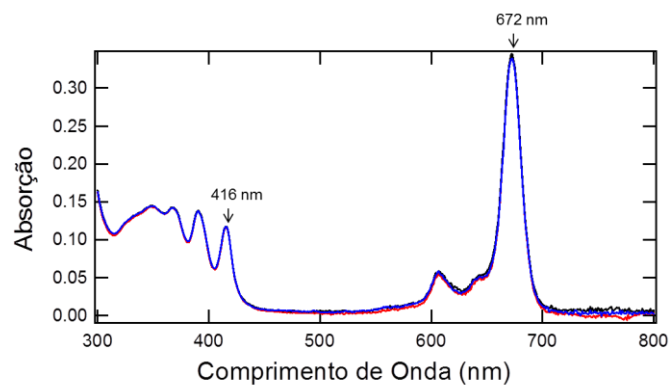


Figura 21. Curva representativa da quantificação em triplicata de ZnS_4Pc e AMB para NC/ $\text{ZnS}_4\text{Pc} + \text{AMB}$. Replicata 1 (■), replicata 2 (■) e replicata 3 (■).

Terminado o processo de produção e quantificação das nanocápsulas é necessário considerar que nem sempre todo o ativo presente na formulação se encontra nanoencapsulado. Afinidades químicas são levadas em consideração entre as moléculas e os componentes pertencentes ao sistema nanoestruturado para que haja, efetivamente, tal processo. Ademais, mesmo que haja a encapsulação, nem todo o ativo necessariamente se encontra no núcleo das NC podendo, também, se alocar na interface entre núcleo e capa polimérica, bem como adsorvido na própria capa polimérica (SCHAFFAZIK *et al.*, 2003). Um experimento adicional foi realizado no intuito de determinar o teor de encapsulação segundo a fórmula descrita no item 4.3.5.

Todos os valores em questão foram calculados segundo os dados obtidos por espectroscopia de absorção. As Tabelas 7 e 8 descrevem os valores encontrados de T.E dos ativos para as NC/ZnS₄Pc e NC mistas, respectivamente.

Tabela 7. Teor de encapsulação de ZnS₄Pc para NC/ZnS₄Pc

TEOR DE ENCAPSULAÇÃO			
	TPC (µg/mL)	LPC (µg/mL)	T.E (%)
ZnS ₄ Pc	21,03	2,18	89,63

Tabela 8. Teor de encapsulação de ZnS₄Pc e AMB para NC/ZnS₄Pc + AMB

TEOR DE ENCAPSULAÇÃO			
	TPC (µg/mL)	LPC (µg/mL)	TE (%)
ZnS ₄ Pc	14,41	1,55	89,24
AMB	35,53	32,90	7,40

Alguns elementos devem ser considerados quando pensamos na encapsulação de compostos químicos. Isso se deve ao fato de que há fatores que atuam diretamente neste procedimento. MORA-HUERTAS *et al.* (2010) descrevem como fatores influenciadores, por exemplo, os métodos empregados de produção de NC, bem como a própria natureza química dos compostos, em que substâncias hidrofílicas atingem valores máximos de 10% de encapsulação, enquanto que para os compostos lipofílicos essa eficiência chega a ser superior a 70%. Desse modo, devido a problemas de afinidade, os compostos hidrofílicos exibem menor eficiência de encapsulação (IMPERIALE, *et al.* 2018)

Os resultados obtidos informam que a ZnS₄Pc, seja para NC/ZnS₄Pc ou NC mistas, foi quase que toda incorporada às NC com teores de encapsulação de 89,63% e 89,24 %, respectivamente, enquanto que a AMB, para as NC mistas, apresenta um teor de 7,40% na presença do PS. O valor expressivo calculado já era esperado durante o preparo e produção das NC considerando a baixíssima solubilidade de ZnS₄Pc tanto em meio orgânico quanto, principalmente, em meio aquoso com alta hidrofobicidade verificada pela prática experimental. Dessa forma, o PS associou-se às NC fugindo do meio aquoso em que as mesmas estavam inseridas. Quanto à baixa encapsulação de AMB, uma possível explicação pode ser considerada tendo como linha de raciocínio a concorrência com o PS para ocupação das NC e, dada a menor afinidade deste ao ambiente aquoso, a AMB naturalmente se localizou externamente, embora, também, apresente baixa afinidade com a água. No que diz respeito ao PS, considerando o seu caráter hidrofóbico, o teor de encapsulação encontra-se de acordo com o que se espera para compostos com tal característica química.

5.5 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE INCUBAÇÃO COM RESAZURINA

Como descrito na seção 4.2.6, foi realizado um experimento preliminar para determinar o melhor tempo de incubação das leveduras com a resazurina seguindo as condições experimentais que seriam utilizadas no ensaio de atividade fotodinâmica antimicrobiana. A resazurina é um corante comercialmente disponível como Alamar Blue® que, em presença de células vivas, sofre uma reação de oxido-redução com mudança de coloração; a redução do corante ocorre pelas enzimas NADH redutase e carnitina desidrogenase (REZENDE *et al.*, 2019), assumindo, após a redução, a coloração rosa. Entretanto, características inerentes a linhagens celulares distintas influenciam as condições do ensaio (REZENDE *et al.*, 2019) justificando diferentes tempos de incubação para diferentes linhagens. A Figura 22 demonstra as bandas normalizadas de absorção da resazurina construídas em função do tempo.

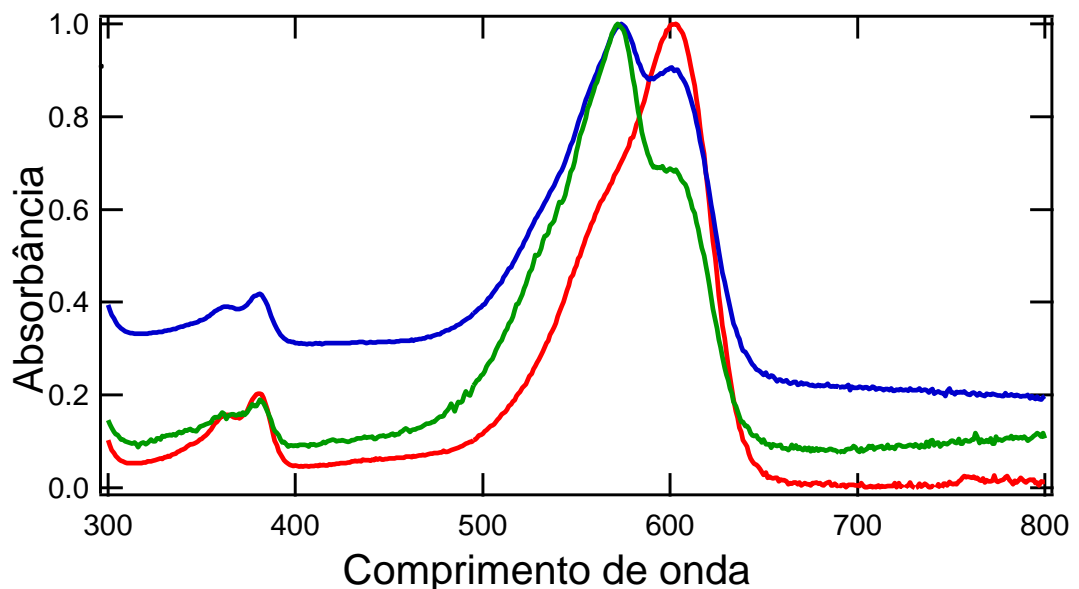


Figura 22. Tempo em horas de incubação de *C. albicans* com resazurina em PBS a 37° C. As linhas coloridas representam diferentes tempos de incubação em que (■) é a incubação com 0h, (■) é a incubação com 24h e (■) é a incubação com 48h.

Observando-se as análises espectrofotométricas é possível notar que no tempo 0 h há uma banda de absorção em 600 nm, característica da presença da resazurina. Com o passar do tempo, atingindo 24 h de incubação, percebemos que começou a ser formada uma banda em 570 nm ao mesmo tempo que diminuía a banda em 600 nm. Tal comportamento é explicado pela presença de resorufina que foi sendo formada devido a metabolização da resazurina pela levedura. Por fim, passadas 48 h a banda em 570 nm ficou mais pronunciada enquanto a de 600 nm diminuiu ainda mais, mostrando já haver ocorrido bastante formação de resorufina no meio. Não estende-se a incubação por maior tempo do que as 48 h, pois não tornou-se viável tal medida, posto que a incubação foi realizada em PBS e o protocolo da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M27A2” que versa sobre “Métodos de referência para testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica” determina tempos de incubação de 24 a 48 h.

5.6 ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR DAS FORMULAÇÕES EM CÉLULAS NIH/3T3 UTILIZANDO RESAZURINA

Como descrito na seção 4.2.7, o ensaio de citotoxicidade foi realizado pelo método da resazurina. Para a execução do ensaio foi utilizada as formulações de NC vazia a 15% (v/v) e de NC Mista diluída a 1%, 2,5%, 5% 10% e 15% (v/v), em que ambas as formulações foram diluídas em meio DMEN sem suplementação. Análises estatísticas foram realizadas e os resultados estão apresentados na Figura 23.

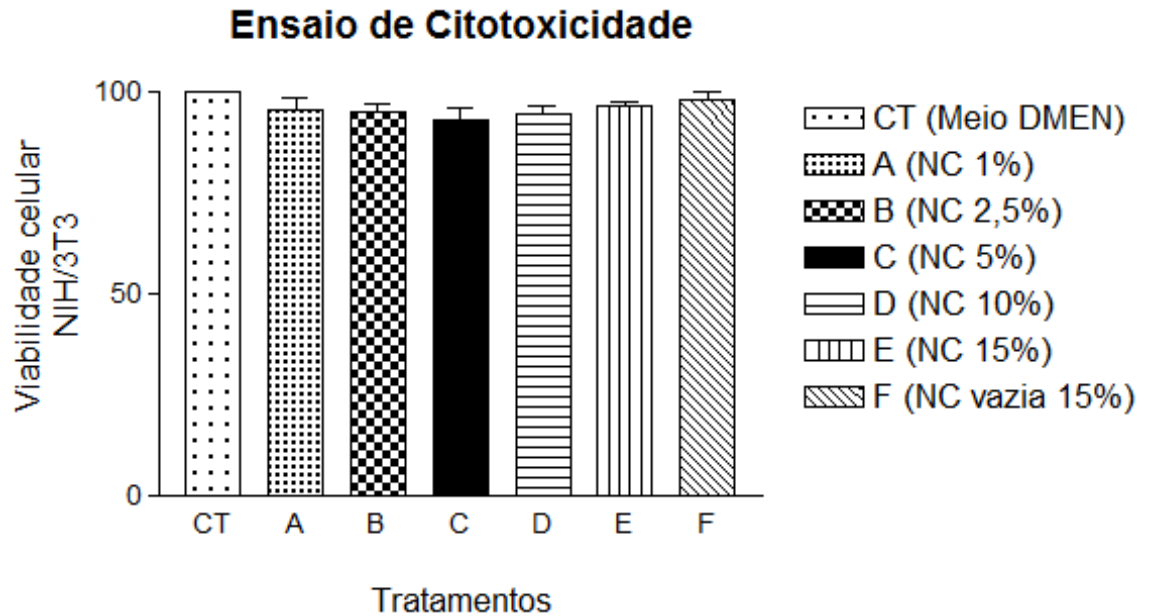


Figura 23. Ensaio de citotoxicidade *in vitro* de NC Vazia e NC Mista em linhagem NIH/3T3 (fibroblastos de murino) utilizando resazurina, em que CT= controle somente com meio DMEN, A= NC Mista diluída a 1% (v/v), B= NC Mista diluída a 2,5% (v/v), C= NC Mista diluída a 5% (v/v), D= NC Mista diluída a 10% (v/v), E= NC Mista diluída a 15% (v/v), e F= NC vazia diluída a 15% (v/v). Foi determinado a significância estatística através do teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).

De acordo com a Figura 23, o resultado das análises estatísticas “*One-way*” ANOVA não demonstram citotoxicidade na ausência de luz para as células NIH/3T3 em contato com as formulações nas diluições empregadas, visto que a viabilidade celular permaneceu acima de 92 % para todas as análises.

Assim exposto, pudemos concluir das análises realizadas que o sistema nanoestruturado empregado, com ou sem as moléculas, apresenta biocompatibilidade adequada de modo a possibilitá-los para aplicação em ensaios futuros de avaliação da atividade fotodinâmica antimicrobiana em modelos *in vitro* e *in vivo*, mediante a observância de protocolos previamente determinados.

5.7 ENSAIO DE ATIVIDADE FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (FOTOINATIVAÇÃO) E MFC

Como mencionado na seção 4.2.8, o ensaio de Atividade Fotodinâmica Antimicrobiana foi realizado, semelhantemente ao ensaio de citotoxicidade, pelo método da resazurina. Utilizou-se, para a execução do ensaio, a formulação de NC Mista diluída a 1 % e 5 % (v/v) em PBS pH 7.4 fotoativadas com sistema de luz LED de 660 nm em Biotable. Análises estatísticas foram realizadas e os resultados estão apresentados na Figura 24.

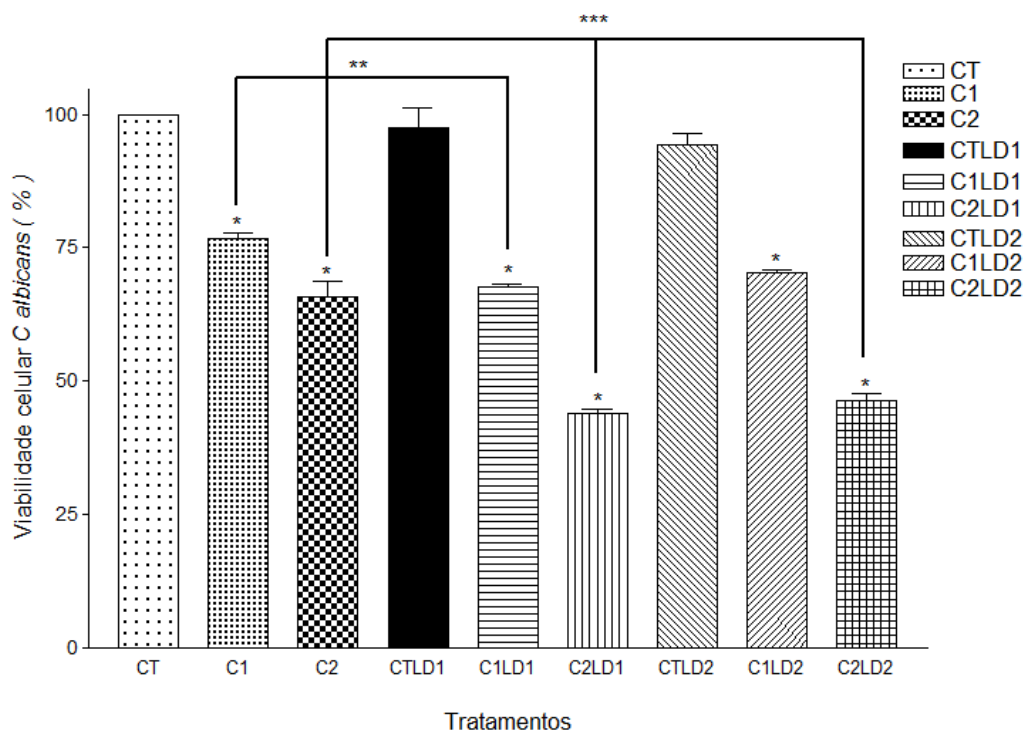


Figura 24. Ensaio de Atividade Fotodinâmica Antimicrobiana *in vitro* de NC Mista em *C. albicans* ATCC® 90028 utilizando resazurina, em que CT= controle somente com PBS, C1= NC Mista diluída a 1% (v/v) no escuro, C2= NC Mista diluída a 5% (v/v) no escuro, CTLD1= Controle com dose de luz 12 J/cm², C1LD1= NC Mista diluída a 1% (v/v) com dose de luz 12 J/cm², C2LD1= NC Mista diluída a 5% (v/v) com dose de luz 12 J/cm², CTLD2= Controle com dose de luz 25 J/cm², C1LD2= NC Mista diluída a 1% (v/v) com dose de luz 25 J/cm², C2LD2= NC Mista diluída a 5% (v/v) com dose de luz 25 J/cm². Foi determinado a significância estatística através do teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido do pós teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (*p<0,001), (**p<0,05) e (**p<0,001)

Consoante ao que se demonstra na Figura 24, o resultado das análises estatísticas *One-way* ANOVA confirmou toxicidade das NC Mistas diluídas a 1% e 5% (v/v) para leveduras de *C. albicans* ATCC® 90028™ tanto na ausência quanto na presença de luz com diminuição da viabilidade celular de no mínimo 23,31% com * $p < 0,001$, isto é, as chances dessa diminuição da viabilidade ser por outra causa que não pelo contato com as NC mistas seja na presença ou ausência de luz é menor que 0,1 %. Considerando apenas as NC Mistas diluídas a 1 % (v/v), notamos que com a irradiação de luz a 12 J/cm² houve uma diminuição ainda maior da viabilidade celular (32,43 %) em relação ao controle, e 9,12 % comparada a mesma formulação na ausência de luz com ** $p < 0,05$, o que evidencia o efeito fotodinâmico, pois as chances de isso ser um engano são menores que 5 %. Com relação as NC mistas diluídas a 5 % (v/v), a irradiação de luz a 12 J/cm² e 25 J/cm² apresentaram, a semelhança das NC mistas diluídas a 1% (v/v), em relação ao controle, diminuição da viabilidade celular, mas agora de 56,08% e 53,72 %, respectivamente, e também foi menor quando confrontado com a formulação na mesma concentração na ausência de luz com *** $p < 0,001$. Mais uma vez pudemos notar a evidência do efeito fotodinâmico ocorrendo e causando toxicidade para o microrganismo alvo.

Ribeiro et al. (2012) realizaram um estudo em que foi avaliado o efeito fotodinâmico antimicrobiano do composto Ftalocianina de cloro-alumínio (CIAIPc) livre e em nanoemulsões catiônicas e aniônicas na concentração 38 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ contra *C. albicans* ATCC 90028™. O estudo demonstra que com dose de luz de 50 J/cm² as nanoemulsões aniônicas, carga de mesma polaridade da encontrada nas nanocápsulas de nosso estudo, foram capazes de diminuir em aproximadamente 50 % a viabilidade das células de *C. albicans* pelo ensaio de XTT, enquanto que as NC mistas de nosso estudo diluídas a 5 % (v/v) (~ 0,64 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ de ZnS₄Pc) com dose

de luz de 12 J/cm^2 foi capaz de reduzir a viabilidade de *C. albicans* em 56 % pelo ensaio da resazurina. Tal fato nos demonstra o potencial do composto ZnS4Pc que, possivelmente com maiores concentrações e doses de luz, pudesse trazer resultados ainda melhores.

Quando analisamos o experimento de Concentração Fungicida Mínima (MFC) (Figura 25) é possível inferir que todo efeito tóxico da formulação frente ao microrganismo não foi capaz de efetivamente matar a célula (efeito fungicida), mas apenas de desacelerar o metabolismo e o crescimento da mesma, o que em outras palavras define-se por efeito fungistático.

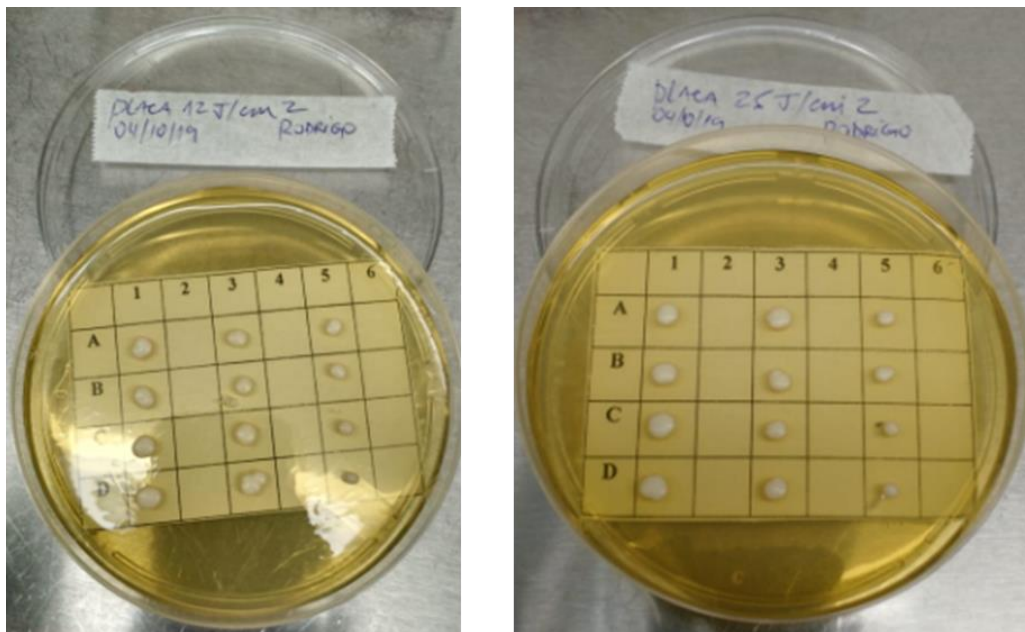


Figura 25. Ensaio de MFC com NC mistas diluídas a 1 % e 5 % (v/v) em PBS e doses de luz de 12 J/cm^2 e 25 J/cm^2 evidenciando efeito fungistático da formulação, em que [A-D]1 = controles de dose luz (células em PBS + luz), [A-D]3 = leveduras com NC Mistas diluídas a 1% (v/v) e [A-D]5 = leveduras com NC Mistas diluídas a 5% (v/v).

6 CONCLUSÕES

As NC foram desenvolvidas e caracterizadas físico-quimicamente, alcançando, assim, o objetivo primeiro do trabalho. As análises apresentaram resultados satisfatórios com tamanhos médios inferiores a 300 nm, índice médio de polidispersão de $0,36 \pm 0,01$ e carga de superfície (Potencial zeta) negativa, cujo valor médio se encontra dentro da região de estabilidade. As análises espectroscópicas de emissão de fluorescência sugerem não ter havido indícios de interação do PS com os componentes da nanocápsula, o que é bom, já que é um indicativo da manutenção da integridade da molécula e manutenção de suas propriedades fotofísicas, permitindo a continuidade dos estudos. A linearidade das curvas analíticas foi conseguida com sucesso traduzindo-se por um valor de $R^2 > 0,999$ para ambas as curvas analíticas, e mantendo uma ótima correlação entre a concentração do analito e absorção da amostra. A concentração teórica das NC mostrou-se muito superior ao LQ do equipamento, permitindo quantificá-los seguramente. Consoante às medidas de quantificação, foi possível notar a existência de perda dos ativos durante o processo de produção de NC/ZnS₄Pc e NC mistas, sendo maiores, sobretudo, para as últimas. O teor de encapsulação de ZnS₄Pc revelou-se alto para a formulação de NC mistas, porém demonstrou baixa encapsulação de AMB. As fotomicrografias de MFA demonstraram NC de formato esférico característico e com tamanhos semelhantes aos encontrados pela técnica de Espalhamento Dinâmico de Luz- DLS. Ensaio de viabilidade celular, utilizando células de fibroblasto de murino (NIH/3T3 ATCC® CRL-1658™) e NC mistas diluídas até 15 % (v/v), não demonstraram citotoxicidade para as primeiras, o que possibilitou continuar com os estudos para avaliação do efeito fotodinâmico antimicrobiano *in vitro*. O ensaio de atividade

fotodinâmica antimicrobiana mostrou considerável efeito tóxico para as células leveduriformes de *C. albicans* ATCC® 90028™, em que na dose de luz de 12 J/cm² em 660 nm e NC Mista diluída a 5 % (v/v) (~ 0,64 µmol.L⁻¹ de ZnS₄Pc) verificou-se redução de 56% da viabilidade celular. Conjectura-se que, possivelmente, com maiores doses de luz e a formulação menos diluída, haja uma potencialização do efeito esperado, requerendo, para isso, mais estudos e ensaios que o comprovem. Todo efeito observado foi devido a uma atividade fungistática, como se observou no ensaio de MFC.

Dito isso, conclui-se que a utilização da nanotecnologia para produção de NC foi de extrema importância para a avaliação de atividade antifúngica de moléculas apolares, cuja atividade não seria possível de ser analisada sem o sistema empregado, dada a insolubilidade das mesmas em meio aquoso. Ademais, a utilização da aPDT mostrou resultados significativamente melhores em comparação à sua não utilização, o que, em outras palavras, justificou sua utilização para a proposta empregada desde o início, sendo, assim, uma ferramenta promissora.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKKARI, A. C. S. *et al.* Inovação tecnológica na indústria farmacêutica: diferenças entre a Europa, os EUA e os países farmaemergentes. **Gestão & Produção**, v. 23, n. 2, p. 365-380, 2016.

ARRUDA, G. J. B. *et al.* Estratégias tecnológicas para formulações de Anfotericina B em sistemas lipídicos disponíveis no mercado farmacêutico e outros promissores sistemas de administração. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 2, p. 59-67, 2016.

BANIK, B. L.; FATTAHI, P; BROWN, J. L. Polymeric nanoparticles: the future of nanomedicine. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 8, n. 2, p. 271-299, 2016.

BECHTOLD, I. H. *et al.* New columnar Zn-phthalocyanine designed for electronic applications. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 116, n. 45, p. 13554-13560, 2012.

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.

CASA, D. M. *et al.* Bovine serum albumin nanoparticles containing amphotericin B were effective in treating murine cutaneous leishmaniasis and reduced the drug toxicity. **Experimental Parasitology**, v. 192, p. 12-18, 2018.

CHAMIEH, J. *et al.* Size characterization of commercial micelles and microemulsions by Taylor dispersion analysis. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 492, n. 1-2, p. 46-54, 2015.

CHEN, Z. *et al.* An effective zinc phthalocyanine derivative for photodynamic antimicrobial chemotherapy. **Journal of Luminescence**, v. 152, p. 103-107, 2014.

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

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010.

DLUGASZEWSKA, J. *et al.* Antimicrobial and anticancer photodynamic activity of a phthalocyanine photosensitizer with N-methyl morpholiniumethoxy substituents in non-peripheral positions. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 172, p. 67-79, 2017.

DUBES, A. *et al.* Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 55, n. 3, p. 279-282, 2003.

ERTEM, B. *et al.* Synthesis, structural characterization, and investigation on photophysical and photochemical features of new metallophthalocyanines. **Journal of Luminescence**, v. 204, p. 464-471, 2018.

FALCI, D. R.; PASQUALOTTO, A. C. Anfotericina B: uma revisão sobre suas diferentes formulações, efeitos adversos e toxicidade. **Clinical and biomedical Research**, Porto Alegre. v. 35, n. 2, p. 65-82, 2015.

FESSI, H. P. F. D. *et al.* Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FIGUEIRAS, A. R. R; COIMBRA, A. B; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p. 14, 2014.

FILIPPIN, F. B.; SOUZA, L. C.. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de Anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 167-194, 2006.

FRESHNEY, R. I. The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. ed. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 71.

GOBO, N. R. da Silva. **Estratégias sintéticas para a preparação de novos fotossensibilizadores do tipo ftalocianinas**. 2013. 205 f. Tese (Mestrado em Química), Centro de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, 2013. Disponível em: <<https://repositorio.ufscar.br/bitstream/handle/ufscar/6555/5184.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 01 Nov, 2017.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: A bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, v. 33, p. 67-73, 2016.

HÖNIGSMANN, H. History of phototherapy in dermatology. **Photochemical & photobiological sciences**, v. 12, n. 1, p. 16-21, 2013.

HU, C. *et al.* Atomic force microscopy characterisation of alkali-silica reaction products to reveal their nanostructure and formation mechanism. **Ceramics International**, v. 44, n. 6, p. 7310-7314, 2018.

IACG. Interagency Coordination Group on Microbiological Resistancy. Não há tempo a perder: Acautelar o futuro contra infeccções resistentes aos medicamentos – Relatório para o Secretário Geral das Nações Unidas. Organização Mundial da Saúde (OMS), Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), Organização Mundial da Saúde Animal (OIE), 2019. Disponível em: https://www.who.int/antimicrobial-resistance/interagency-coordination-group/IACG_final_summary_PT.pdf?ua=1.

ICH. Guideline Harmonized Tripartite. Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1). *In*: ICH. **International Conference on Harmonization**, Geneva. 2005. p. 11-12.

IMPERIALE, J. C. *et al.* Polymer-based carriers for ophthalmic drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 285, p. 106-141, 2018.

INSTRUMENTS, Malvern. Zetasizer nano series user manual. **MAN0317**, v. 1, p. 288, 2004.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501-511, 2010.

JAYME, C. C.; DE PAULA, L. B.; REZENDE, N.; CALORI, I. R.; FRANCHI, L. P.; TEDESCO, A. C. DNA polymeric films as a support for cell growth as a new material for regenerative medicine: Compatibility and applicability. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 404-412, 2017.

LANGEVIN, D. *et al.* Towards reproducible measurement of nanoparticle size using dynamic light scattering: Important controls and considerations. **NanoImpact**, v. 10, p. 161-167, 2018.

LEE, J. J.; YAZAN, L. S.; ABDULLAH, Che Azurahanim Che. A review on current nanomaterials and their drug conjugate for targeted breast cancer treatment. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2373, 2017.

LI, Q. *et al.* A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, v. 7, n. 6, p. 122, 2017.

LI, X. *et al.* Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 379, p. 147-160, 2017.

LIU, X. *et al.* A comparison of in vitro cytotoxicity assays in medical device regulatory studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 97, p. 24-32, 2018,

MARÍN, R. R. R.; BABICK, F.; HILLEMANN, L. Zeta potential measurements for nonspherical colloidal particles—Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 516-521, 2017.

MELO, M. T. de. **Atividade de nanocápsulas contendo ftalocianina de cloro alumínio associada a fármacos leishmanicidas baseado na terapia fotodinâmica**, 2015. 144 f. Tese (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/59/59138/tde-07102015-144424/pt-br.php>>. Acesso em 10 Jan, 2019.

MELO, M. A. de.; CÁSSIA, W. de.; PERUSSI, J. R. Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 33, n. 3, p. 331-340, 2012.

MELVILLE, O. A.; LESSARD, B. H.; BENDER, T. P. Phthalocyanine-based organic thin-film transistors: a review of recent advances. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 7, n. 24, p. 13105-13118, 2015.

MESA-ARANGO, A. C.; SCORZONI, L.; ZARAGOZA, O. It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, Article 286, p. 1-10, 2012.

MILADI, K. *et al.* Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies. **Industrial Crops and Products**, v. 72, p. 24-33, 2015.

MONTEIRO, S. da. C.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1-2, p. 113-142, 2010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard-M27A2. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2002.

NIKALJE, A. P. Nanotechnology and its applications in medicine. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 081-089, 2015.

OLIVEIRA, K. T. de. *et al.* Conceitos fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do tipo Porfirinas, clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2014.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. A crescente ameaça da resistência antimicrobiana: Opções de ação. Geneva, 2012. 16 p. Disponível em: <https://www.afro.who.int/sites/default/files/201706/OMS_IER_PSP_2012.2_por.pdf> . Acesso em: 10 Ago. 2017.

RAMALHO, M. J. *et al.* Receptor-mediated PLGA nanoparticles for glioblastoma multiforme treatment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 545, n. 1-2, p. 84-92, 2018.

RAVAL, N. *et al.* Importance of Physicochemical Characterization of Nanoparticles in Pharmaceutical Product Development. *In*: TEKADE, R.K.; RAVAL, N. *et al.* **Basic Fundamentals of Drug Delivery**. Academic Press, 2019. p. 369-400.

RAWAT, M. *et al.* Nanocarriers: promising vehicle for bioactive drugs. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 9, p. 1790-1798, 2006.

REZENDE, N. *et al.* Standardization of a resazurin-based assay for the evaluation of metabolic activity in oral squamous carcinoma and glioblastoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 371-374, 2019.

RIBEIRO, A. P. D. *et al.* Photodynamic Inactivation of Planktonic Cultures and Biofilms of *Candida albicans* Mediated by Aluminum-Chloride-Phthalocyanine Entrapped in Nanoemulsions. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 1, p. 111-119, 2012.

RIZVI, S. A. A; SALEH, A. M. Applications of nanoparticle systems in drug delivery technology. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 26, n. 1, p.64-70, 2017.

SATTLER, K. D. **Handbook of nanophysics**: Nanoparticles and Quantum Dots. Boca Raton: CRC Press; Taylor & Francis Group, 2010. 708 p. Disponível em: <<https://www.taylorfrancis.com/books/9781420075458>>. Acesso em: 01 Ago. 2017.

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

SHEIKH, N. *et al.* Antifungal drug resistance in Candida species. **European Journal of General Medicine**, v. 10, n. 4, p254-258, 2013.

SHEINGOLD, B. H.; HAHN, J. A. The history of healthcare quality: The first 100 years 1860–1960. **International Journal of Africa Nursing Sciences**, v. 1, p. 18-22, 2014.

SILVA, C. *et al.* Administração oral de peptídeos e proteínas: II. Aplicação de métodos de microencapsulação. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, n. 1, p. 1-20, 2003.

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

SOUTO, E. B. *et al.* Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II. **Polímeros**, v. 22, n. 1, p. 101-106, 2012.

SOUZA, A. C. O. *et al.* Activity and in vivo tracking of Amphotericin B loaded PLGA nanoparticles. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 95, p. 267-276, 2015.

TIYABOONCHAI, W. Chitosan nanoparticles: a promising system for drug delivery. **Naresuan University Journal**, v. 11, n. 3, p. 51-66, 2013.

VAROTTO, A. *et al.* Phthalocyanine blends improve bulk heterojunction solar cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 132, n. 8, p. 2552-2554, 2010.

XU, M.; MCCANNA, D. J.; SIVAK, J. G. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 71, p. 1-7, 2015.

WALSH, T.J.; FINBERG, R.W.; ARNDT, C.; HIEMENZ, J.; SCHWARTZ, C.; BODENSTEINER, D, *et al.* Liposomal amphotericin B for empirical therapy in patients with persistent fever and neutropenia. **New England Journal of Medicine**.v. 340, n. 10, p. 764-771, 1999. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJM199903113401004>.

8 APÊNDICES

Tabela 1. Análises físico-químicas de NC/Vazias pelo método do DLS com desvio-padrão.

NC/ VAZIAS			
Dias	Tamanho de partícula (nm)	Pdl	Zeta (mV)
8	172,9 ± 0,7	0,21 ± 0,01	-25,40 ± 0,20
15	170,5 ± 2,4	0,25 ± 0,01	-16,53 ± 1,11
22	172,5 ± 0,5	0,24 ± 0,01	-23,37 ± 2,59
31	172,7 ± 1,0	0,22 ± 0,01	-21,20 ± 0,53
64	175,4 ± 1,0	0,25 ± 0,01	-19,07 ± 1,03
71	179,3 ± 2,5	0,27 ± 0,02	-14,40 ± 0,56
78	176,1 ± 1,4	0,24 ± 0,00	-26,17 ± 0,06
87	177,1 ± 1,7	0,28 ± 0,01	-17,77 ± 0,76
Média	174,6 ± 2,9	0,24 ± 0,02	-20,49 ± 4,26

Tabela 2. Análises físico-químicas de NC/ZnS₄Pc pelo método do DLS com desvio-padrão.

NC/ ZnS₄Pc			
Dias	Tamanho de partícula (nm)	Pdl	Zeta (mV)
5	253,9 ± 3,2	0,41 ± 0,01	-15,33 ± 0,67
19	252,3 ± 4,2	0,48 ± 0,04	-34,10 ± 0,46
26	247,0 ± 5,0	0,43 ± 0,02	-20,27 ± 1,05
33	221,9 ± 3,7	0,36 ± 0,02	-27,97 ± 0,61
47	259,5 ± 3,6	0,52 ± 0,02	-18,03 ± 0,51
68	260,7 ± 6,1	0,51 ± 0,05	-31,43 ± 0,70
96	274,8 ± 2,2	0,55 ± 0,03	-27,10 ± 0,46
Média	252,9 ± 16,2	0,47 ± 0,07	-24,89 ± 7,09

Tabela 3. Análises físico-químicas de NC/AMB pelo método do DLS com desvio-padrão.

NC/ AMB			
Dias	Tamanho de partícula (nm)	Pdl	Zeta (mV)
5	220,3 ± 8,5	0,43 ± 0,04	-20,70 ± 0,20
19	234,0 ± 13,7	0,42 ± 0,01	-41,00 ± 3,36
26	301,5 ± 45,9	0,39 ± 0,06	-39,90 ± 0,30
33	414,1 ± 27,3	0,45 ± 0,05	-25,47 ± 0,55
47	304,2 ± 42,0	0,52 ± 0,07	-19,50 ± 0,26
68	295,4 ± 23,3	0,47 ± 0,08	-29,37 ± 196
96	406,6 ± 145,9	0,45 ± 0,12	-21,37 ± 1,23
Média	310,9 ± 75,6	0,45 ± 0,04	-28,19 ± 9,02

Tabela 4. Análises físico-químicas de NC/ZnS₄Pc + AMB pelo método do DLS com desvio-padrão.

NC/ ZnS₄Pc + AMB			
Dias	Tamanho de partícula (nm)	Pdl	Zeta (mV)
19	273,8 ± 3,2	0,35 ± 0,01	-23,90 ± 1,05
47	226,6 ± 4,8	0,34 ± 0,01	-24,43 ± 0,51
117	269,9 ± 1,1	0,38 ± 0,01	-32,27 ± 0,32
124	246,0 ± 3,7	0,38 ± 0,01	-33,90 ± 1,05
145	249,3 ± 5,6	0,36 ± 0,03	-37,07 ± 0,67
158	257,3 ± 4,8	0,37 ± 0,01	-34,60 ± 0,46
Média	253,8 ± 17,3	0,36 ± 0,01	-31,03 ± 5,54