

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta **Tese** será disponibilizado somente a partir de 29/04/2027.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CAMPUS DE ARARAQUARA



MARIZA AIRES FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO 3D DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA
UTILIZANDO-SE NANOCÁPSULAS DE FENIL-TIO-FTALOCIANINA DE ZINCO**

ARARAQUARA-SP
2025

MARIZA AIRES FERNANDES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO 3D DE CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA
UTILIZANDO-SE NANOCÁPSULAS DE FENIL-TIO-FTALOCIANINA DE ZINCO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação
em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e
Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos,
da Faculdade de Ciências Farmacêuticas Júlio de
Mesquita Filho, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

ARARAQUARA-SP
2025

F363d Fernandes, Mariza Aires.
Desenvolvimento e caracterização de modelo 3d de carcinoma epidermoide oral para aplicação em terapia fotodinâmica utilizando-se nanocápsulas de fenil-tio-ftalocianina de zinco / Mariza Aires Fernandes. – Araraquara, 2025.
121 f. : il.

Tese (Doutorado) – 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. Engenharia de tecidos. 2. Modelo de câncer oral engenheirado.
3. Carcinoma epidermoide oral. 4. Terapia fotodinâmica.
5. Nanobiotecnologia. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara
Kazumi Tomoyose - CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6

Esta ficha não pode ser modificada



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento e caracterização de modelo 3D de carcinoma epidermoide oral para aplicação em terapia fotodinâmica utilizando-se nanocápsulas de fenil-tio-ftalocianina de zinco

AUTORA: MARIZA AIRES FERNANDES

ORIENTADOR: FERNANDO LUCAS PRIMO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área: Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. RICARDO DELLA COLETTA (Participação Virtual)
Departamento de Diagnóstico Oral / Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

Profa. Dra. ANDREZA RIBEIRO SIMIONI (Participação Virtual)
Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento - IP&D / Universidade do Vale do Paraíba (UNIVAP)

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Araraquara



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Prof. Dr. RONDINELLI DONIZETTI HERCULANO (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas -
UNESP - Araraquara

Araraquara, 29 de abril de 2025

IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA

A pesquisa proposta visa impactar diretamente os Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS), enfatizando o ODS 3 (Boa Saúde e Bem-estar). O impacto esperado abrange diferentes áreas: 1) Científica e Técnica: O modelo 3D permitirá uma compreensão aprofundada dos efeitos fotodinâmicos no câncer bucal, favorecendo o desenvolvimento de terapias mais eficazes e menos invasivas, alinhadas aos avanços da biotecnologia e nanotecnologia. 2) Social: A pesquisa contribui para a redução da mortalidade por câncer e melhora da qualidade de vida dos pacientes ao oferecer uma alternativa terapêutica mais segura e eficaz. 3) Inovadora e Econômica: A abordagem inovadora propõe a utilização de novos biomateriais e processos terapêuticos que podem reduzir custos com tratamentos convencionais e gerar novas oportunidades de mercado, além de fomentar o desenvolvimento de tecnologias aplicáveis a outras áreas da saúde. 4) Educacional e Cultural: Além de contribuir para a formação de novos profissionais nas áreas de biotecnologia e terapias inovadoras, a pesquisa promove a disseminação de conhecimento de ponta. 5) Internacionalização e Inserção Local: Com potencial de colaboração internacional, a pesquisa reforça a inserção da ciência brasileira em um contexto global, além de contribuir para o fortalecimento do sistema de saúde local e nacional. 6) Desenvolvimento Sustentável: A utilização de biomateriais e práticas sustentáveis ao longo do desenvolvimento da pesquisa fortalece o compromisso com a sustentabilidade, em linha com os ODS 9, 11, 12, 15, 16 e 17.

POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH

The proposed research aims to directly impact the Sustainable Development Goals (SDGs), emphasizing SDG 3 (Good Health and Well-being). The expected impact covers different areas:

- 1) Scientific and Technical: The 3D model will allow an in-depth understanding of the photodynamic effects on oral cancer, favoring the development of more effective and less invasive therapies, aligned with advances in biotechnology and nanotechnology.
- 2) Social: The research contributes to reducing cancer mortality and improving patients' quality of life by offering a safer and more effective therapeutic alternative.
- 3) Innovative and Economic: The innovative approach proposes the use of new biomaterials and therapeutic processes that can reduce costs with conventional treatments and generate new market opportunities, in addition to fostering the development of technologies applicable to other areas of health.
- 4) Educational and Cultural: In addition to contributing to the training of new professionals in the areas of biotechnology and innovative therapies, research promotes the dissemination of cutting-edge knowledge.
- 5) Internationalization and Local Insertion: With potential for international collaboration, research reinforces the insertion of Brazilian science in a global context, in addition to contributing to the strengthening of the local and national health system.
- 6) Sustainable Development: The use of biomaterials and sustainable practices throughout the development of research strengthens the commitment to sustainability, in line with SDGs 9, 11, 12, 15, 16 and 17.

Dedico este trabalho ao meu amor e companheira, Lays Rodrigues Moura, pelo carinho, apoio e incentivo incondicional ao longo dessa jornada. E às mulheres da minha família, especialmente à minha mãe, M^a Nadilza Aires Galvão, e à minha avó Benedita Pimenta Galvão (in memoriam), exemplos de força, persistência e amor que me inspiram diariamente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e fortalecer minha jornada nos momentos de dúvida e medo.

À minha amada esposa Lays, por ser meu porto seguro e por me apoiar incondicionalmente na realização deste trabalho e durante o estágio no exterior. Pela presença constante nos momentos difíceis e felizes, por construir ao meu lado uma família cheia de amor, cuidado e parceria – incluindo nossos filhos de quatro patas, Molly, Lola e Marley –, minha eterna gratidão!

À minha querida mãe Nadilza, por ser meu exemplo de mãe, mulher e profissional. Agradeço por todo o apoio e incentivo desde os primeiros passos na alfabetização até os desafios do mestrado, doutorado e estágios na Europa. Sua presença foi fundamental, especialmente nos momentos difíceis. Sou eternamente grata por tudo que fez e continua fazendo por mim.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, pelos ensinamentos e pelo apoio constante ao longo de todo o processo. Um exemplo de pessoa e pesquisador, com empatia, competência e dedicação, qualidades que motivam e inspiram seus alunos. Agradeço pela confiança e autonomia durante o desenvolvimento desta pesquisa. Sem sua orientação, este trabalho não seria possível. Sou muito grata por tudo que aprendi com você.

Aos amigos do grupo GNanoEngineers (especialmente à Floricultura do Gnano), Stéphanie, Débora, Fernanda e Matheus, que com certeza tornaram esta reta final do doutorado muito mais leve e prazerosa.

Aos técnicos Ana, Adriana, Flavio, Mateus e Ivan, pelo profissionalismo e disponibilidade em sempre oferecer apoio. A todos os colegas do Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP, meu agradecimento pela colaboração durante todo este processo.

À equipe da seção técnica de Pós-graduação, agradeço pelo suporte sempre presente. Vocês são essenciais.

Agradeço a *School of Clinical Dentistry, University of Sheffield, UK* por toda infraestrutura para realização do estágio de pesquisa no exterior.

À Profa. Dra. Helen E. Colley e ao Prof. Dr. Craig Murdoch, pela oportunidade e supervisão do trabalho no exterior. Aos membros do grupo de pesquisa, Dra. Asma El Howati, Faisal S. Alhedyan, Zinah H. Shakir, Cerys E. Evans, e especialmente à Dra. Amy L. Harding, pela ajuda nos experimentos com os modelos 3D, além do acolhimento e ensinamentos valiosos.

Aos meus amigos, especialmente à minha melhor amiga Luiza Dezem Ambrósio, que esteve ao meu lado na maior parte da minha vida e que tive a felicidade de reencontrar durante a BEPE. Obrigada por tornar essa experiência mais leve e enriquecedora.

Aos amigos que fiz em Sheffield (Grupo da trilha pra ver 'Preda'): Thais, Leonardo, Sissa, Beatriz, Letícia, Tamires, Henrique e Harvey. Agradeço por todas as experiências compartilhadas e pelo impacto significativo que tiveram no meu crescimento profissional e pessoal.

Ao laboratório de Farmacotécnica e Tecnologia Farmacêutica-FCFAr/UNESP pela disponibilidade de utilização do DLS.

Quero agradecer ao Prof. Dr. Marlus Chorilli e Profa. Dra. Morgana Rodrigues Guimarães Stabili pelas valiosas contribuições em meu Exame de Qualificação.

A todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a concretização deste trabalho, mesmo que seus nomes não tenham sido mencionados, expresso minha sincera gratidão.

Esta pesquisa utilizou instalações do Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI). Agradeço à equipe da instalação de criomicroscopia pelo auxílio durante os experimentos (proposta nº 20243078).

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

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) – Processos nº 2020/09396-8 e 2023/10385-9, pelas bolsas de doutorado e estágio no exterior, como apoio

financeiro. “As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade do(s) autor(es) e não necessariamente refletem a visão da FAPESP”.

DECLARAÇÃO

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Ética da Unesp (disponível em https://www2.unesp.br/Home/ouvidoria_ses/codigo-de-etica.pdf). Afirmo não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude acadêmica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo, na íntegra, as responsabilidades de autoria.

"Tudo que acontece no universo tem uma razão de ser; um objetivo. Nós como seres humanos, temos uma só lição na vida: seguir em frente e ter a certeza de que apesar de as vezes estar no escuro, o sol vai voltar a brilhar." Irmã Dulce

RESUMO

Modelos 2D de cultura celular são amplamente utilizados em estudos *in vitro*. No entanto, esses modelos não são capazes de mimetizar o ambiente tumoral, o que pode resultar em respostas falso-positivas. Para superar essa limitação, modelos 3D têm sido desenvolvidos na tentativa de reproduzir a complexidade das células neoplásicas e do microambiente tumoral. A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma estratégia terapêutica promissora, especialmente em lesões pré-malignas da cabeça e pescoço, bem como na cavidade oral. As ftalocianinas ligadas ao zinco (ZnPcs) são fotossensibilizadores (FS) eficazes, mas sua aplicação é limitada pela baixa solubilidade em solventes orgânicos. Nesse contexto, sistemas de liberação como as nanocápsulas podem melhorar a eficácia desses fotossensibilizadores. Desta forma, este estudo visou desenvolver e caracterizar um modelo 3D de carcinoma epidermoide oral para aplicação em TFD utilizando nanocápsulas de fenil-tio-ftalocianina de zinco (NC/ZnS₄Pc). As nanocápsulas foram obtidas pelo método de deposição interfacial do polímero pré-formado e caracterizadas fotofísica e físico-quimicamente. Além disso, foi realizada a quantificação do FS e o estudo de liberação *in vitro*. Modelos 2D e 3D foram utilizados para avaliar a biocompatibilidade, internalização e eficácia terapêutica de NC/ZnS₄Pc associada à TFD. Os resultados mostraram que as nanocápsulas apresentaram distribuição homogênea de tamanho, NC/ZnS₄Pc tendo um Tamanho de partícula de $323,5 \pm 7,7$ nm e Potencial Zeta de $-24,5 \pm 5,29$ mV. A taxa de encapsulação de ZnS₄Pc foi de $88,40 \pm 0,43\%$, e a liberação *in vitro* mostrou um perfil sustentado de 33% ao final de 24 horas. A TFD com NC/ZnS₄Pc foi eficaz em reduzir a viabilidade celular das linhagens H357 e HSC-3, com uma taxa de apoptose significativa observada após o tratamento em H357. Além disso, a TFD em associação com NC/ZnS₄Pc foi eficaz na indução de morte celular em esferoides tumorais de HSC-3. Modelos de engenharia tecidual da mucosa oral foram desenvolvidos com fibroblastos e epitélio composto por células FNB6, H357 ou FaDu para modelar tecidos normais e cancerígenos. A internalização de NC/ZnS₄Pc foi observada principalmente após 24 horas nos modelos de câncer oral. O tratamento com TFD no modelo H357-MCOE resultou em uma redução significativa na viabilidade celular (5,32%) após 24 horas de tratamento com luz (50 J/cm²). Os resultados deste estudo demonstram que as nanocápsulas de ZnS₄Pc apresentam grande potencial para aplicações terapêuticas, com destaque para sua eficácia no tratamento de câncer oral, em modelos 2D, 3D e de engenharia tecidual, reforçando sua viabilidade para estudos futuros em TFD.

Palavras-chave: engenharia de tecidos; modelo de câncer oral engenheirado; carcinoma epidermoide oral; terapia fotodinâmica; nanobiotecnologia.

ABSTRACT

Monolayer cell culture models are widely used in in vitro studies. However, they are not able to adequately mimic the tumor microenvironment, which may result in false-positive responses. To overcome this limitation, 3D models have been developed to reproduce the complexity of neoplastic cells and the tumor microenvironment. Photodynamic Therapy (PDT) is a promising therapeutic strategy, particularly in premalignant lesions of the head and neck, as well as in the oral cavity. Zinc phthalocyanines (ZnPcs) are effective photosensitizers, but their application is limited by their low solubility in organic solvents. In this context, delivery systems such as nanocapsules can enhance the effectiveness of these photosensitizers. This study aimed to develop and characterize a 3D model of oral squamous cell carcinoma for PDT application using zinc phenyl-thio-phthalocyanine nanocapsules (NC/ZnS₄Pc). Nanocapsules were obtained by the interfacial deposition method and characterized physicochemically and photophysically. Additionally, the photosensitizer quantification and in vitro release study were performed. Both 2D and 3D models were used to assess the biocompatibility, internalization, and therapeutic efficacy of NC/ZnS₄Pc associated with PDT. The results showed that the nanocapsules exhibited a homogeneous size distribution, a Particle size of 323.5 ± 7.7 nm and a Zeta potential of -24.5 ± 5.29 mV for NC/ZnS₄Pc. The ZnS₄Pc encapsulation efficiency was $88.40 \pm 0.43\%$, and the in vitro release showed a sustained profile with 33% release after 24 hours. PDT with NC/ZnS₄Pc effectively reduced cell viability in the H357 and HSC-3 cell lines, with a significant apoptosis rate observed after treatment. Furthermore, multicellular tumor spheroids (MCTS) demonstrated NC/ZnS₄Pc toxicity without light, and PDT was effective in inducing cell death in HSC-3 spheroids. Oral mucosa tissue engineering models were developed with fibroblasts and an epithelium composed of FNB6, H357, or FaDu cells to model normal and cancerous tissues. The internalization of NC/ZnS₄Pc was observed mainly after 24 hours in oral cancer models. PDT treatment in the H357-TEOCM model resulted in a significant reduction in cell viability (5.32%) after 24 hours of light exposure (50 J/cm²). The results of this study demonstrate that ZnS₄Pc nanocapsules have great potential for therapeutic applications, especially in oral cancer treatment, in 2D, 3D, and tissue engineering models, reinforcing their feasibility for future studies in PDT.

Keywords: tissue engineering; engineered oral cancer model; oral squamous cell carcinoma; photodynamic therapy; nanobiotechnology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da mucosa oral. Imagem histológica (esquerda) e esquemática (direita). Barra de escala = 100 μm	28
Figura 2 - Estrutura química do FS, Zinco Fenil – Tio – Ftalocianina.	32
Figura 3 - Representação esquemática da estrutura geral das nanocápsulas e nanoesferas (a seta indica a presença do fármaco/bioativo nas nanopartículas).	33
Figura 4 - Representação esquemática do método de Método de deposição interfacial do polímero pré-formado descrito por Fessi et al. (1989) com adaptações.	38
Figura 5 - Linhagens celulares utilizadas. A) Fibroblastos orais normais (NOF359); B) Queratinócitos orais imortalizados (FNB6); C) Fibroblastos humanos primários, neonatal (HDFn); D) Queratinócitos humanos imortalizados (HaCaT); E) Células epiteliais de carcinoma espinocelular oral humano (H357); F) Células de carcinoma epidermóide de boca (HSC3); G) Células isoladas de um tumor hipofaríngeo (FaDu). Objetiva 10x.	49
Figura 6 - A) Laser Therapy XT. (DMC Enterprise, São Carlos, Brasil); B) Experimento de Terapia Fotodinâmica em monocamada utilizando o laser a 660 nm com doses de energia de 15 J/cm ² , 30 J/cm ² e 50 J/cm ² , potência de 100 mW.	53
Figura 7 - Caracterização de NC vazia (A) e NC/ZnS ₄ Pc(B) por criomicroscopia eletrônica de transmissão (Cryo-TEM).....	63
Figura 8 - Espectros de absorção (A) e absorção normalizada (B); espectros de emissão de fluorescência (C) e emissão normalizada (D). ZnS ₄ Pc livre (preto) e NC/ZnS ₄ Pc (cinza). As soluções estoque foram preparadas em DMSO e as leituras realizadas após diluição em acetonitrila.	65
Figura 9 - A) Espectro 3D de ZnS ₄ Pc livre (A) e NC/ZnS ₄ Pc (B) correlacionando espectro de emissão, excitação e intensidade de fluorescência. E seus respectivos gráficos de contorno (C) ZnS ₄ Pc livre e (D) NC/ZnS ₄ Pc gerados pelo espectrofluorímetro RF 6000 (Shimadzu).	66
Figura 10 - Espectros de fluorescência de ZnS ₄ Pc em diferentes concentrações (0,256–1,024 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) em ACN. Inserção: gráfico da concentração de ZnS ₄ Pc vs. Intensidade de fluorescência.	67
Figura 11 - Espectros de fluorescência de ZnS ₄ Pc na concentração de 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Diluições realizadas nos meios de liberação. Meio 1: PBS: Tween 80: DMSO (75:0,4:24,6, v/v); Meio 2: PBS: Tween 80 (99,6:0,4, v/v); Meio 3: PBS: Tween 80: DMSO (75:15:10, v/v); Meio 4: PBS: Tween 80: DMSO (75:10:15, v/v); Meio 5: PBS: Tween 80: EtOH 70% (75:10:15, v/v); PBS (1% SDS): Tween 80: EtOH 70% ((75:10:15, v/v); PBS (1% SDS).....	72

Figura 12 - Espectros de fluorescência de ZnS ₄ Pc em diferentes concentrações (0,128–1,024 µg. mL ⁻¹) em meio de liberação. Inserção: gráfico da concentração de ZnS ₄ Pc vs. Intensidade de fluorescência.	73
Figura 13 - Espectros de fluorescência de ZnS ₄ Pc em PBS: Tween 80: DMSO (75:15:10, v/v). Ensaio de solubilidade (n=3).	79
Figura 14 - Perfil de liberação in vitro de ZnS ₄ Pc livre e ZnS ₄ Pc carregado em nanocápsulas poliméricas (Nc-ZnS ₄ Pc), n=3.	80
Figura 15 - Estudos em monocamada (2D) – Citotoxicidade no escuro de NC/ZnS ₄ Pc em diferentes linhagens celulares humanas: A) fibroblastos (HDFn), B) fibroblastos orais (NOF359) C) queratinócitos (HaCaT), D) queratinócitos orais (FNB6), E) e F) linhagens de câncer oral (HSC3 e H357) e G) linhagem de tumor hipofaríngeo (FaDu), utilizando resazurina nos tempos de 3, 24 e 48 h. CT(-): controle negativo; ZnS ₄ Pc: ativo livre na concentração de 5,4 µmol.L ⁻¹ ; NC Vazia: NC sem o ativo fotossensível; 0,5; 1,0; 2,0; 3,5 e 5,4: concentração de ZnS ₄ Pc em nanocápsulas (µmol.L ⁻¹). A significância estatística foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas (**p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), n=3.	84
Figura 16 - Estudos em monocamada (2D) - Análise da captação intracelular do ZnS ₄ Pc livre e NC/ZnS ₄ Pc nas linhagens celulares HDFn (A), HaCaT (B), HSC-3 (C) H357 (D) e FaDu (E) após 1h, 3h e 24h de incubação com 1,0 e 2,0 µmol. L ⁻¹ do ativo. A significância estatística foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida do pós-teste de Tukey para comparações múltiplas (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), n=3.	86
Figura 17 - Estudo em monocamada - Cinética de internalização das nanocápsulas por citometria de fluxo na linhagem celular H357 em diferentes tempos (5min, 1h, 3h e 24h). ...	87
Figura 18 - Estudos em monocamada - Viabilidade celular utilizando o ensaio de resazurina após TFD nas linhagens celulares tumorais A) HSC3, B) H357 e C) FaDu. Grupos controle em placas distintas dos grupos irradiados. CT(-): controle negativo; ZnS ₄ Pc: ativo livre na concentração de 5,4 µmol. L ⁻¹ ; NC (sem luz): NC com o ativo fotossensibilizador e sem irradiação; 15J/cm ² ; 30J/cm ² e 50J/cm ² : grupos incubados com 2,0 µmol. L ⁻¹ de ZnS ₄ Pc nas nanocápsulas e submetidos a diferentes doses do laser. A significância estatística foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), n=3.	89
Figura 19 - Estudos de monocamada - Efeito da TFD e NC/ZnS ₄ Pc no apoptose da linhagem celular epitelial humana OSCC (H357). As células apoptóticas foram analisadas por citometria	

de fluxo após coloração com Anexina V-FITC e IP. A porcentagem de células é representada em quadrantes. (A) Controle positivo - corado; (B) Controle negativo - não corado; (C) Tratamento com dose de 15 J/cm²; (D) Tratamento com dose de 30 J/cm²; (E) Tratamento com dose de 50 J/cm²; e (F) Tratamento com dose de 50 J/cm² sem incubação das nanocápsulas. 91

Figura 20 - Esferoides tumorais multicelulares (MCTS) analisados por microscopia de luz. À esquerda, esferoide HSC-3 (7 dias); no centro, esferoide H357 (5 dias); e à direita, esferoide FaDu (5 dias). Os estudos de citotoxicidade nos esferoides foram realizados com NC/ZnS₄Pc sob condições de escuridão, utilizando resazurina após 24 h de tratamento. As condições experimentais foram: CT(-): controle negativo; C+: DMSO 50%; PC: ativo livre a 10 µmol.L⁻¹; NC Vazia: NC sem o ativo fotossensível; 2,0; 3,5; 5,4 e 10: concentrações de ZnS₄Pc em nanocápsulas (µmol.L⁻¹). A significância estatística foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA), seguida pelo pós-teste de Tukey (**p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), n=3. 93

Figura 21 - Avaliação do efeito da TFD nos esferoides de HSC-3. Grupos controle em placas distintas dos grupos irradiados. CT(-): controle negativo; NC CT2 (sem luz):NC com o ativo fotossensibilizador e sem irradiação; 30J/cm² e 50J/cm²: grupos incubados com 10 µmol. L⁻¹ de ZnS₄Pc nas nanocápsulas e submetidos a diferentes doses do laser. A significância estatística foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey para comparações múltiplas (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001), n=3. 95

Figura 22 - Produção de modelos 3D de engenharia de tecidos. (A) insertos submersos em meio de cultura e incubados por 2 dias (B) interface ar-líquido. 96

Figura 23 - Análise histológica. (A) Modelo de mucosa oral normal projetado por engenharia tecidual (MMONE) gerado usando NOF-FNB6 após 14 dias de ALI; (B) Modelo de câncer oral projetado por engenharia tecidual H357 (H357-MCOE) após 7 dias de ALI e (C) Modelo de câncer oral projetado por engenharia tecidual FaDu (FaDu-MCOE) gerado usando NOF-FaDu após 7 dias de ALI. Aumento de 20x. 97

Figura 24 - Avaliação da toxicidade de NC/ZnS₄Pc em ausência de luz. (A) H357-MCOE e (B) FADU-MCOE usando resazurina em um tempo de 24h. CT (-): controle, CT (+): DMSO 50%; ZnS₄Pc: ativo livre em uma concentração de 10 µmol. L⁻¹; Vazio: NC sem o ativo fotossensível; 3,5; 5,4 e 10: concentração de ZnS₄Pc em nanocápsulas (µmol. L⁻¹). A significância estatística foi determinada por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida pelo pós-teste de Tukey para comparações múltiplas (*p<0,05; ** p<0,01; *** p<0,001), n=3. 98

Figura 25 - Estudo de internalização de nanocápsulas (Azul) em H357-MCOE em diferentes 3h e 24h usando microscopia confocal. Os núcleos das células foram marcados com DAPI (azul) e emissão do próprio ativo fotossensibilizador internalizado (vermelho).....	100
Figura 26 - Viabilidade usando ensaio de resazurina após TFD em H357-MCOE. Incubação por 24h com NC/ZnS ₄ Pc. CT (-): controle; Nc 10 µmol. L ⁻¹ : NC/ZnS ₄ Pc na concentração de 10 µmol. L ⁻¹ sem irradiação de luz; CT 50 J/cm ² : Tratamento com dose de luz de 50 J/cm ² sem incubação das nanocápsulas; NC 50 J/cm ² : NC/ZnS ₄ Pc na concentração de 10 µmol. L ⁻¹ e tratamento com dose de luz de 50 J/cm ²	102
Figura 27 - Distribuição do tamanho de partícula de nanocápsulas poliméricas contendo ZnS ₄ Pc, obtida por análise de DLS (Dynamic Light Scattering) utilizando Zetasizer. Os dados correspondem a uma única medição realizada 24 horas após a formação das nanocápsulas. (A) NC/ZnS ₄ Pc e (B) NC vazia.	116
Figura 28 - Distribuição do Potencial Zeta de nanocápsulas poliméricas contendo ZnS ₄ Pc, obtida por análise de Potencial Zeta utilizando Zetasizer. Os dados correspondem a uma única medição realizada 24 horas após a formação das nanocápsulas. (A) NC/ZnS ₄ Pc e (B) NC vazia.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Meios receptores testados no ensaio de liberação in vitro de ZnS ₄ Pc.....	43
Tabela 2 - Representação dos valores obtidos para Tamanho de partícula, Índice de polidispersividade e Potencial Zeta (média com os respectivos desvios).....	62
Tabela 3 - Resumo dos resultados obtidos para a análise da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão do método.....	69
Tabela 4 - Resumo dos resultados obtidos para a análise da seletividade do método.....	70
Tabela 5 - Valores obtidos para LD e LQ	70
Tabela 6 - Dados de eficiência de encapsulação de ZnS ₄ Pc em nanocápsulas.	71
Tabela 7 - Resumo dos resultados obtidos para a análise da precisão (repetibilidade e precisão intermediária) e exatidão do método.....	75
Tabela 8 - Resumo dos resultados obtidos para a análise da seletividade do método.....	76
Tabela 9 - Valores obtidos para LD e LQ	76
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA one-way) dos valores obtidos pelo método espectrofluorimétrico em acetonitrila e para o meio de liberação.	78
Tabela 11 - Valores de R ² referentes aos diferentes modelos matemáticos, calculados para o estudo liberação in vitro de ZnS ₄ Pc a partir das nanocápsulas.	81

LISTA DAS PRINCIPAIS ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
CECO	Carcinoma epidermóide de cavidade oral
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs	Espécies reativas de Oxigênio
ET	Engenharia de Tecidos
FaDu	Linhagem celular isolada de um tumor hipofaríngeo
FS	Fotossensibilizador
H357	Linhagem epitelial humana de carcinoma espinocelular oral
HaCaT	Linhagem de queratinócitos
HDFn	Linhagem de fibroblasto humano primário, neonatal
IPD	Índice de polidispersão
MCOE	Modelo de câncer oral engenheirado
MMONE	Modelo de mucosa oral normal engenheirada
NC	Nanocápsula polimérica
NC/ ZnS ₄ Pc	Nanocápsulas contendo fenil-tio-ftalocianina de zinco
NOF	Fibroblastos orais normais
OSCC	Carcinoma oral de células escamosas
PLGA	Poli (ácido láctico-co-ácido glicólico)
PZ	Potencial Zeta
TFD	Terapia Fotodinâmica
TP	Tamanho de partícula
ZnPCs	Ftalocianinas ligadas ao zinco
ZnS ₄ Pc	fenil-tio-ftalocianina de zinco

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	26
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	28
2.1. CÂNCER ORAL.....	28
2.2. TERAPIA FOTODINÂMICA	30
2.2.1. Fotossensibilizadores: Ftalocianinas	30
2.3. SISTEMAS DE LIBERAÇÃO DE FÁRMACOS: NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS.....	32
2.4. MODELO TRIDIMENSIONAL DE CULTURA DE CÉLULAS E ENGENHARIA DE TECIDOS.....	34
3. OBJETIVOS.....	37
3.1. OBJETIVO GERAL	37
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4. METODOLOGIA	38
4.1. PARTE 1 – DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOCÁPSULAS.....	38
4.1.1. Método de preparo das nanocápsulas poliméricas contendo derivado ftalocianínico .	38
4.1.2. Caracterização fotofísica e físico-química do sistema nanoestruturado.....	39
4.1.2.1. Determinação do Diâmetro médio, Índice de polidispersidade (IPD) e Potencial Zeta.....	39
4.1.2.2. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Cryo-TEM).....	39
4.1.2.3. Determinação dos espectros de absorção no UV/Vis e emissão de fluorescência no estado estacionário	40
4.1.3. Desenvolvimento de método espectrofluorimétrico para quantificação e teor de encapsulação de ZnS ₄ Pc nas nanocápsulas	40
4.1.3.1. Linearidade.....	41
4.1.3.2. Seletividade.....	41
4.1.3.3. Precisão	41
4.1.3.4. Exatidão – recuperação.....	41
4.1.3.5. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	42
4.1.4. Quantificação e teor de encapsulação de ZnS ₄ Pc nas nanocápsulas	42
4.1.5. Estudo do perfil de liberação in vitro de ZnS ₄ Pc	43
4.1.5.1. Escolha do meio de liberação.....	43
4.1.6. Desenvolvimento de método espectrofluorimétrico para determinação de ZnS ₄ Pc no ensaio de liberação	43

4.1.6.1. Linearidade.....	44
4.1.6.2. Seletividade.....	44
4.1.6.3. Precisão.....	44
4.1.6.4. Exatidão – recuperação.....	45
4.1.6.5. Limite de detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ)	45
4.1.7. Estudo do perfil de liberação in vitro: Estudo de solubilidade de ZnS ₄ Pc.....	45
4.1.7.1. Determinação do perfil de liberação in vitro de ZnS ₄ Pc: Ensaio de liberação utilizando sacos de diálise	46
4.1.7.2. Análise da cinética de liberação in vitro de ZnS ₄ Pc.....	46
4.2. PARTE 2 - ENSAIOS BIOLOGICOS.....	47
4.2.1. MANUTENÇÃO DAS CULTURAS CELULARES	47
4.2.1.1. Cultura celular de fibroblastos e queratinócitos.....	47
4.2.1.2. Cultura de células tumorais.....	47
4.2.2. ENSAIOS EM MONOCAMADA	50
4.2.2.1. Estudo de citotoxicidade: Método da Resazurina (HDFn, HaCaT, NOFs e FNB6 – No escuro)	50
4.2.2.2. Estudo de citotoxicidade em monocamada: Método da Resazurina (HSC-3; H357 e FaDu – No escuro).....	50
4.2.2.3. Captação intracelular de ZnS ₄ Pc	51
4.2.2.4. Análise cinética de internalização usando citometria de fluxo	51
4.2.2.5. Terapia fotodinâmica in vitro utilizando NC/ZnS ₄ Pc.....	52
4.2.2.6. Detecção de apoptose por citometria de fluxo	53
4.2.3. ENSAIO EM ESFEROIDES TUMORAIS	54
4.2.3.1. Produção de esferoides tumorais.....	54
4.2.3.2. Estudo de citotoxicidade em esferoides: Método da Resazurina (HSC-3; H357 e FaDu – No escuro).....	54
4.2.3.3. Terapia fotodinâmica em esferoides utilizando NC/ZnS ₄ Pc	55
4.2.4. ENSAIOS EM MODELOS DE MUCOSA ORAL ENGENHEIRADA	55
4.2.4.1. Extração do colágeno tipo I	55
4.2.4.1.1. Processo de liofilização do colágeno tipo I.....	56
4.2.4.2. Produção de modelos de mucosa oral engenheirada	56
4.2.4.3. Análise Histológica	57
4.2.4.4. Estudo de toxicidade em H357-MCOE: Método da Resazurina (No escuro)	57

4.2.4.5. Análise da cinética de internalização usando microscopia confocal (H357-MCOE).....	58
4.2.4.6. Terapia Fotodinâmica em H357-MCOE.....	58
4.3. FORMA DE ANÁLISE DOS RESULTADOS	59
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1. CARACTERIZAÇÃO FOTOFÍSICA E FÍSICO-QUÍMICA DO SISTEMA NANOESTRUTURADO	60
5.1.1. Determinação do Tamanho de partícula e Potencial Zeta	60
5.1.2. Criomicroscopia eletrônica de transmissão (Cryo-TEM).....	62
5.1.3. Determinação dos espectros de absorção UV/VIS e emissão de fluorescência no estado estacionário.....	64
5.2. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA QUANTIFICAÇÃO E TEOR DE ENCAPSULAÇÃO DE ZNS ₄ PC NAS NANOCÁPSULAS	67
5.2.1. Linearidade	67
5.2.2. Precisão.....	68
5.2.3. Exatidão	68
5.2.4. Seletividade.....	70
5.2.5. Limite de detecção e de quantificação.....	70
5.3. Quantificação e teor de encapsulação de ZnS ₄ Pc nas nanocápsulas	71
5.4. ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO DE ZNS ₄ PC	71
5.4.1. Escolha do meio de liberação	71
5.5. DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO ESPECTROFLUORIMÉTRICO PARA DETERMINAÇÃO DE ZNS ₄ PC NO ENSAIO DE LIBERAÇÃO	72
5.5.1. Linearidade	72
5.5.2. Precisão.....	73
5.5.3. Exatidão	74
5.5.4. Seletividade.....	76
5.5.5. Limite de detecção e de quantificação.....	76
5.6. ESTUDO DO PERFIL DE LIBERAÇÃO IN VITRO: ESTUDO DE SOLUBILIDADE DE ZNS ₄ PC.....	78
5.6.1. Determinação do perfil de liberação in vitro de ZnS ₄ Pc: Ensaio de liberação utilizando membranas de diálise.....	79
5.6.2. Análise da cinética de liberação in vitro de ZnS ₄ Pc.....	80
5.7. ENSAIOS BIOLÓGICOS EM MONOCAMADA	82
5.7.1. Estudo da citotoxicidade: Método da Resazurina (No escuro).....	82

5.7.2. Captação intracelular de ZnS ₄ Pc	85
5.7.3. Análise cinética de internalização usando citometria de fluxo	87
5.7.4. Terapia fotodinâmica in vitro utilizando NC/ZnS ₄ Pc	87
5.7.5. Detecção de apoptose por citometria de fluxo	89
5.8. ENSAIOS BIOLOGICOS EM ESFEROIDES	92
5.8.1. Estudo de citotoxicidade em esferoides: Método da Resazurina (HSC-3; H357 e FaDu – No escuro)	92
5.8.2. Terapia fotodinâmica em esferoides utilizando NC/ZnS ₄ Pc	94
5.9. ENSAIOS EM MODELOS DE MUCOSA ORAL ENGENHEIRADA	96
5.9.1. Análise Histológica	96
5.9.2. Estudo de toxicidade em H357-MCOE: Método da Resazurina (No escuro)	98
5.9.3. Análise da cinética de internalização usando microscopia confocal (H357-MCOE) ..	99
5.9.4. Terapia Fotodinâmica em H357-MCOE	101
6. CONCLUSÕES	103
7. PERSPECTIVAS	104
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	105
APÊNDICE A - GRÁFICOS TAMANHO HIDRODINÂMICO MÉDIO E	116
POTENCIAL ZETA	116
APÊNDICE B – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS DERIVADOS DE COLABORAÇÕES CIENTÍFICAS (NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO DOUTORADO)	117
APÊNDICE C – ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS COMO PRIMEIRA AUTORA. (NO PERÍODO DE REALIZAÇÃO DO DOUTORADO)	119
ANEXO A – PARECER Nº 18/2021 – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.	121

1. INTRODUÇÃO

O câncer oral é uma doença que acomete as regiões dos lábios e cavidade oral, caracterizado por encontrar-se de forma predominante na língua e o assoalho da boca, podendo desenvolver-se também na mucosa da boca, gengivas, região retromolar e palato mole (Bagan *et al.*, 2010; Montero; Patel, 2015). O carcinoma espinocelular oral (do inglês *squamous cell carcinoma* – OSCC) corresponde a mais de 90% dos casos de câncer oral, sendo sua ocorrência diretamente associada à exposição epitelial crônica ao álcool e tabaco (Tan *et al.*, 2023). De acordo com a última estimativa mundial da Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), o câncer de lábio e cavidade oral ocupam a 16ª posição em incidência e mortalidade e notou-se que as taxas de incidência foram mais altas em homens principalmente no sul e sudeste da Ásia e Pacífico Ocidental (Bray *et al.*, 2024).

Cerca de 60% dos pacientes com OSCC são diagnosticados em estágios avançados, com disseminação nodular e metástase, o que reduz as opções terapêuticas e frequentemente exige ressecções cirúrgicas extensas e mutilantes (Tan *et al.*, 2023). Portanto, as abordagens terapêuticas convencionais para o carcinoma epidermóide de cavidade oral (CECO) são limitadas pela complexidade da neoplasia, resistência terapêutica e potencial metastático (Papalazarou *et al.*, 2018).

Diante disso, a Terapia Fotodinâmica (TFD) apresenta-se como uma modalidade terapêutica minimamente invasiva e vêm sendo empregada para diversos tipos de terapias, incluindo câncer e lesões não malignas (Mohammad-Hadi *et al.*, 2018). Seu mecanismo baseia-se na interação dos três elementos essenciais: uma agente fotossensibilizante (FS), responsável por absorver luz em um comprimento de onda determinado, luz em um comprimento de onda específico e oxigênio, reagindo em conjunto para produzir espécies reativas de oxigênio (ERO) que em última instância causam a morte celular das células e tecidos alvo (Bhuvaneswari *et al.*, 2015; Primo *et al.*, 2011).

Apesar do potencial terapêutico da TFD, limitações como citotoxicidade e interação inespecífica dos FS com membranas celulares exigem estratégias de veiculação. As ftalocianinas de zinco (ZnPcs), especialmente a ZnS₄Pc, destacam-se por sua alta geração de oxigênio singleto, absorção em >630 nm e seletividade tumoral (Roguin *et al.*, 2019). No entanto, sua baixa solubilidade e uso de surfactantes dificultam a aplicação clínica. Modificações com grupos tio-fenil aumentam a fototoxicidade, mas podem afetar a biocompatibilidade (Detty; Gibson; Wagner, 2004; Primo *et al.*, 2011; Siqueira-Moura *et al.*,

2013). Assim, sua incorporação em nanossistemas é essencial para ampliar a eficácia e segurança terapêutica.

Na literatura são encontrados alguns estudos clínicos sobre o uso da TFD em lesões pré-malignas de cabeça e pescoço, bem como na cavidade oral. Neste contexto, a TFD é uma ferramenta promissora na odontologia com aplicações em cirurgia oral e bucomaxilofacial, endodontia, odontologia preventiva, periodontologia e implantologia (Saini *et al.*, 2016; Stájer *et al.*, 2020).

Para o câncer oral em fase inicial (localizado em regiões superficiais da cavidade oral), o uso da TFD provoca redução significativa da morbidade quando comparada com as intervenções cirúrgicas tradicionais. No entanto, a aplicação da TFD no carcinoma epidermoide oral é um grande desafio pois os parâmetros como fonte de luz, fotossensibilizador, dose e frequência do tratamento ainda não foram bem estabelecidas, sendo o modelo tridimensional de câncer oral uma excelente proposta para avaliação pré-clínica *in vitro* e determinação de protocolos baseados nas vantagens do uso da Engenharia Tecidual (Saini *et al.*, 2016; Stájer *et al.*, 2020).

Assim, existe uma demanda pelo desenvolvimento de modelos biológicos úteis para a compreensão dos processos de progressão tumoral, além da resistência associada às terapias utilizadas são descritas na literatura para diversas neoplasias, mas ainda são de extrema complexidade e sem modelos tridimensionais tumorais bem definidos (Chatterjee *et al.*, 2020; Gigliotti *et al.*, 2019; Kerawala *et al.*, 2016; Montero; Patel, 2015).

Diante disso, justifica-se a necessidade de desenvolvimento de modelo tridimensional modificado com células de carcinoma epidermoide oral, baseado em protocolos de Engenharia de Tecidos, além de constituir uma abordagem inovadora com a aplicação da TFD e da nanotecnologia, como perspectiva de alternativa terapêutica padronizada em um modelo tumoral de câncer oral avançado, como forma de mimetizar condições biológicas de ensaios *in vivo* e auxiliar no entendimento dos efeitos biológicos desencadeados pelos processos fotodinâmicos.

6. CONCLUSÕES

Nanocápsulas poliméricas contendo fenil-tio-ftalocianina de zinco (ZnS₄Pc) foram obtidas com sucesso por meio do método de deposição interfacial do polímero pré-formado. As caracterizações iniciais indicaram tamanhos de partícula, índice de polidispersidade (IPD) e Potencial Zeta adequados para aplicações biomédicas.

As análises espectroscópicas de absorção e emissão confirmaram que ZnS₄Pc não interage com os componentes do sistema, preservando sua integridade e propriedades fotofísicas, fundamentais para garantir a eficácia da terapia fotodinâmica (TFD).

Foram desenvolvidos dois métodos espectrofluorimétricos lineares, sensíveis e exatos que permitiram quantificar com precisão o fotossensibilizador encapsulado, com concentração superior ao limite de quantificação (LQ) do equipamento. A associação do ZnS₄Pc ao nanocarreador foi eficiente, evidenciando boa incorporação ao sistema reservatório.

O ensaio de solubilidade permitiu a definição das condições ideais para os estudos de liberação *in vitro* dentro das condições *sink*. A liberação do ZnS₄Pc foi avaliada por meio de membranas de diálise de celulose (12-14 kDa), sendo observada uma difusão superior a 90% para o fármaco livre em 24 horas, indicando que a membrana não limitou a liberação. O ZnS₄Pc encapsulado apresentou um perfil de liberação sustentada, com aproximadamente 25% liberado nas primeiras horas e cerca de 33% ao final de 24 horas.

A citotoxicidade das nanocápsulas foi avaliada em modelos 2D e 3D, com destaque para a redução de viabilidade celular em linhagens tumorais H357 (24,14%) e HSC-3 (11,33%) após TFD. Nos esferoides tumorais de carcinoma oral (HSC-3), a combinação de TFD e NC/ZnS₄Pc induziu uma taxa de morte celular de cerca de 32,91%, e a apoptose foi detectada nas células H357.

Modelos tridimensionais de engenharia tecidual foram desenvolvidos utilizando células humanas em matriz de colágeno tipo I, sendo caracterizados histologicamente. A aplicação da TFD associada a NC/ ZnS₄Pc resultou em uma redução ainda mais acentuada da viabilidade celular no H357-MCOE, destacando sua relevância na avaliação pré-clínica da terapia fotodinâmica.

Através deste estudo ficou evidenciado o potencial das nanocápsulas poliméricas contendo ZnS₄Pc como uma estratégia promissora para a terapia fotodinâmica no tratamento do câncer oral. Os resultados obtidos em modelos 2D e 3D evidenciam a eficácia do sistema, destacando sua seletividade tumoral e capacidade de induzir morte celular em diferentes modelos experimentais. Este trabalho contribui para o avanço das terapias antitumorais,

oferecendo uma plataforma para o desenvolvimento de tratamentos mais específicos e menos invasivos.

7. Perspectivas

Este estudo representa um avanço significativo na aplicação da terapia fotodinâmica (TFD) para o câncer oral, por meio da veiculação da ZnS4Pc em nanocápsulas poliméricas. Os próximos passos envolvem a validação pré-clínica em modelos animais, com foco na avaliação da eficácia terapêutica, perfil de segurança e biodistribuição. Além disso, a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos, por meio da análise de biomarcadores, permitirá uma compreensão mais aprofundada da resposta biológica à TFD. A consolidação desses dados aproxima este sistema terapêutico da translação clínica, contribuindo para o desenvolvimento de abordagens mais eficazes, seguras e personalizadas no tratamento do câncer oral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOUELMAGD, S. A.; SUN, B.; CHANG, A. C.; KU, Y. J.; YEO, Y. Release Kinetics Study of Poorly Water-Soluble Drugs from Nanoparticles: Are We Doing It Right?. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 12, n. 3, p. 997–1003, 2015.

AHLAWAT, J.; HENRIQUEZ, G.; NARAYAN, M. Enhancing the Delivery of Chemotherapeutics: Role of Biodegradable Polymeric Nanoparticles. **Molecules**, [s. l.], v. 23, n. 9, p. 2157, 2018.

AIRES-FERNANDES, M.; AMANTINO, C. F.; DO AMARAL, S. R.; PRIMO, F. L. Tissue Engineering and Photodynamic Therapy: A New Frontier of Science for Clinical Application -An Up-To-Date Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, [s. l.], v. 10, 2022.

ALÉPÉE, N. State-of-the-art of 3D cultures (organs-on-a-chip) in safety testing and pathophysiology. **ALTEX**, [s. l.], p. 441–477, 2014.

ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, [s. l.], v. 5, n. 2, p. 161–169, 2001.

AMANTINO, C. F.; DE BAPTISTA-NETO, Á.; BADINO, A. C.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L. Anthraquinone encapsulation into polymeric nanocapsules as a new drug from biotechnological origin designed for photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 31, p. 101815, 2020.

AZEVEDO, R. B.; FABER, J.; LEAL, S.; LUCCI, C. Histologia da Cavidade Oral. **Sistema Digestório: Integração Básico-Clínica**, [s. l.], p. 215–226, 2016.

BAGAN, J.; SARRION, G.; JIMENEZ, Y. Oral cancer: Clinical features. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 46, n. 6, p. 414–417, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.009>.

BARBUGLI, P. A.; ALVES, C. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Photodynamic therapy utilizing liposomal ClAlPc in human melanoma 3D cell cultures. **Experimental Dermatology**, [s. l.], v. 24, n. 12, p. 970–972, 2015.

BASKARAN, R.; LEE, J.; YANG, S. G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. **Biomaterials Research**, [s. l.], v. 22, 2018. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6158913/](http://pmc/articles/PMC6158913/). Acesso em: 21 ago. 2022.

BELL, E.; EHRLICH, H. P.; BUTTLE, D. J.; NAKATSUJI, T. Living tissue formed in vitro and accepted as skin-equivalent tissue of full thickness. **Science**, [s. l.], v. 211, n. 4486, p. 1052–1054, 1981.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not?. **Journal of Controlled Release**, [s. l.], v. 235, p. 337–351, 2016.

BHUVANESWARI, R.; NG, Q. F.; THONG, P. S. P.; SOO, K. C. Nimotuzumab increases the anti-tumor effect of photodynamic therapy in an oral tumor model. **Oncotarget**, [s. l.], v. 6, n. 15, p. 13487–13505, 2015.

BRANCATO, V.; OLIVEIRA, J. M.; CORRELO, V. M.; REIS, R. L.; KUNDU, S. C. Could 3D models of cancer enhance drug screening?. **Biomaterials**, [s. l.], v. 232, n. July 2019, p. 119744, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.119744>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução RDC n. 166, de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, seção 1, Brasília, DF, v. 141, n. 25, p. 87, jul. 2017.

BRAY, F.; LAVERSANNE, M.; SUNG, H.; FERLAY, J.; SIEGEL, R. L.; SOERJOMATARAM, I.; JEMAL, A. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024.

BROEKGAARDEN, M.; RIZVI, I.; BULIN, A. L.; PETROVIC, L.; GOLDSCHMIDT, R.; MASSODI, I.; CELLI, J. P.; HASAN, T. Neoadjuvant photodynamic therapy augments immediate and prolonged oxaliplatin efficacy in metastatic pancreatic cancer organoids. **Oncotarget**, [s. l.], v. 9, n. 16, p. 13009–13022, 2018.

BRUCH, J. M.; TREISTER, N. S. **Clinical oral medicine and pathology**. [S. l.: s. n.], 2010.

CANDIDO, N. M.; DE MELO, M. T.; FRANCHI, L. P.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; RAHAL, P.; CALMON, M. F. Combining photodynamic therapy and chemotherapy: Improving breast cancer treatment with nanotechnology. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 994–1008, 2018.

CARLSSON, J.; YUHAS, J. M. **Liquid-overlay culture of cellular spheroids**. [S. l.: s. n.], 1984.

CEYLAN, S.; BÖLGEN, N. A review on three dimensional scaffolds for tumor engineering. **Biomaterials and Biomechanics in Bioengineering**, [s. l.], v. 3, n. 3, p. 141–155, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.12989/bme.2016.3.3.141>.

CHATTERJEE, A.; LASKAR, S. G.; CHAUKAR, D. Management of early oral cavity squamous cancers. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 104, n. February 2019, p. 104627, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2020.104627>.

CHOI, H.; LIM, W.; KIM, J. E.; KIM, I.; JEONG, J.; KO, Y.; SONG, J.; YOU, S.; KIM, D.; KIM, M.; KIM, B. K.; KIM, O. Cell death and intracellular distribution of hematoporphyrin in a KB cell line. **Photomedicine and Laser Surgery**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. 453–460, 2009.

COLLEY, H E; HEARNENDEN, V.; JONES, A. V; WEINREB, P. H.; VIOLETTE, S. M.; MACNEIL, S.; THORNHILL, M. H.; MURDOCH, C. Development of tissue-engineered models of oral dysplasia and early invasive oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 105, n. 10, p. 1582–1592, 2011.

COLLEY, H. E.; HEARNDEN, V.; AVILA-OLIAS, M.; CECCHIN, D.; CANTON, I.; MADSEN, J.; MACNEIL, S.; WARREN, N.; HU, K.; MCKEATING, J. A.; ARMES, S. P.; MURDOCH, C.; THORNHILL, M. H.; BATTAGLIA, G. Polymersome-mediated delivery of combination anticancer therapy to head and neck cancer cells: 2D and 3D in vitro evaluation. **Molecular Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2014.

COLLEY, H. E.; SAID, Z.; SANTOCILDES-ROMERO, M. E.; BAKER, S. R.; D'APICE, K.; HANSEN, J.; MADSEN, L. S.; THORNHILL, M. H.; HATTON, P. V.; MURDOCH, C. Pre-clinical evaluation of novel mucoadhesive bilayer patches for local delivery of clobetasol-17-propionate to the oral mucosa. **Biomaterials**, [s. l.], v. 178, 2018.

CRAMER, S. W.; CHEN, C. C. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. **Frontiers in Surgery**, [s. l.], v. 6, n. January, p. 1–11, 2020.

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

DANAEI, M.; DEGHANKHOLD, M.; ATAEL, S.; HASANZADEH DAVARANI, F.; JAVANMARD, R.; DOKHANI, A.; KHORASANI, S.; MOZAFARI, M. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 10, n. 2, p. 57, 2018.

DE ANDRADE, D. F.; ZUGLIANELLO, C.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; BECK, R. C. R. Assessing the In Vitro Drug Release from Lipid-Core Nanocapsules: a New Strategy Combining Dialysis Sac and a Continuous-Flow System. **AAPS PharmSciTech**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 1409–1417, 2015.

DE ANNUNZIO, S. R.; COSTA, N. C. S.; GRAMINHA, M. A. S.; FONTANA, C. R.; MEZZINA, R. D. Chlorin, phthalocyanine, and porphyrin types derivatives in phototreatment of cutaneous manifestations: A review. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 16, 2019.

DE MATOS, R. P. A.; CALMON, M. F.; AMANTINO, C. F.; VILLA, L. L.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; RAHAL, P. Effect of Curcumin-Nanoemulsion Associated with Photodynamic Therapy in Cervical Carcinoma Cell Lines. **BioMed Research International**, [s. l.], v. 2018, p. 1–11, 2018.

DE PAULA, C. S.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 49, n. 3, p. 371–381, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejps.2013.03.011>.

DE SOUZA, T. D.; ZIEMBOWICZ, F. I.; MÜLLER, D. F.; LAUERMANN, S. C.; KLOSTER, C. L.; SANTOS, R. C. V.; LOPES, L. Q. S.; OURIQUE, A. F.; MACHADO, G.; VILLETTI, M. A. Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 83, p. 88–98, 2016.

DEMIR DUMAN, F.; DEMIR DUMAN, F.; SEBEK, M.; SEBEK, M.; THANH, N. T. K.; THANH, N. T. K.; LOIZIDOU, M.; SHAKIB, K.; MACROBERT, A. J. Enhanced photodynamic therapy and fluorescence imaging using gold nanorods for porphyrin delivery in a novel: In vitro squamous cell carcinoma 3D model. **Journal of Materials Chemistry B**, [s. l.], v. 8, n. 23, p. 5131–5142, 2020.

DENG, S.; GIGLIOBIANCO, M. R.; CENSI, R.; DI MARTINO, P. Polymeric Nanocapsules as Nanotechnological Alternative for Drug Delivery System: Current Status, Challenges and Opportunities. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. 847, 2020.

DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 47, n. 16, p. 3897–3915, 2004.

DOKE, S. K.; DHAWALE, S. C. Alternatives to animal testing: A review. **Saudi Pharmaceutical Journal**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 223–229, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2013.11.002>.

EDMANS, J.; CLITHEROW, K.; MURDOCH, C.; HATTON, P.; SPAIN, S.; COLLEY, H. Mucoadhesive Electrospun Fibre-Based Technologies for Oral Medicine. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 12, n. 6, p. 504, 2020.

EVANGELISTA, R. P.; AMANTINO, C. F.; PIETRO, R. C. L. R.; SORRECHIA, R.; PIAZZA, R. D.; MARQUES, R. F. C.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L. Copolymer-nanocapsules of zinc phenyl-thio-phthalocyanine and amphotericin-B in association with antimicrobial photodynamic therapy (A-PDT) applications against *Candida albicans* yeasts. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 34, p. 102273, 2021.

FADEL, M.; KASSAB, K.; ABDEL FADEEL, D. Zinc phthalocyanine-loaded PLGA biodegradable nanoparticles for photodynamic therapy in tumor-bearing mice. **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 25, n. 2, p. 283–292, 2010.

FERREIRA, S. B. de S.; SLOWIK, K. M.; CASTRO HOSHINO, L. V. de; BAESSO, M. L.; MURDOCH, C.; COLLEY, H. E.; BRUSCHI, M. L. Mucoadhesive emulgel systems containing curcumin for oral squamous cell carcinoma treatment: From pre-formulation to cytotoxicity in tissue-engineering oral mucosa. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, [s. l.], v. 151, p. 105372, 2020.

FESSI, H.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. Ph.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 55, n. 1, p. R1–R4, 1989.

FISHER, M. F.; RAO, S. S. Three-dimensional culture models to study drug resistance in breast cancer. **Biotechnology and Bioengineering**, [s. l.], v. 117, n. 7, p. 2262–2278, 2020.

FLORIANO, B. F.; CARVALHO, T.; LOPES, T. Z.; TAKAHASHI, L. A. U.; RAHAL, P.; TEDESCO, A. C.; CALMON, M. F. Effect of berberine nanoemulsion Photodynamic therapy on cervical carcinoma cell line. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 33, p. 102174, 2021.

FORTEATH, S.; ANTUNES, E.; CHIDAWANYIKA, W.; NYOKONG, T. Synthesis and photophysical behavior of a novel zinc phthalocyanine containing a single carboxylic acid and three phenylthio substituents. **Journal of Luminescence**, [s. l.], v. 132, n. 9, p. 2318–2324, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jlumin.2012.03.050>.

FRANK, L. A.; CONTRI, R. V.; BECK, R. C. R.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Improving drug biological effects by encapsulation into polymeric nanocapsules. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 623–639, 2015.

FRANK, L. A.; GAZZI, R. P.; DE ANDRADE MELLO, P.; BUFFON, A.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S. Imiquimod-loaded nanocapsules improve cytotoxicity in cervical cancer cell line. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, [s. l.], v. 136, p. 9–17, 2019.

GHANI, F.; KRISTEN, J.; RIEGLER, H. Solubility Properties of Unsubstituted Metal Phthalocyanines in Different Types of Solvents. **Journal of Chemical & Engineering Data**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 439–449, 2012.

GIGLIOTTI, J.; MADATHIL, S.; MAKHOUL, N. Delays in oral cavity cancer. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [s. l.], v. 48, n. 9, p. 1131–1137, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2019.02.015>.

GILL, B. J.; WEST, J. L. Modeling the tumor extracellular matrix: Tissue engineering tools repurposed towards new frontiers in cancer biology. **Journal of Biomechanics**, [s. l.], v. 47, n. 9, p. 1969–1978, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiomech.2013.09.029>.

GOEL, A. N.; LONG, J. L. **The oral cavity**. [S. l.]: Elsevier Inc., 2018. 2018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-56930-9.00002-4>.

GUIRO, K.; ARINZEH, T. L. Bioengineering Models for Breast Cancer Research. **Breast Cancer: Basic and Clinical Research**, [s. l.], v. 9s2, p. 57–70, 2015.

HAO, Y.; CHUNG, C. K.; YU, Z.; HUIS IN 'T VELD, R. V.; OSSENDORP, F. A.; TEN DIJKE, P.; CRUZ, L. J. Combinatorial Therapeutic Approaches with Nanomaterial-Based Photodynamic Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. 120, 2022.

HAPACH, L. A.; MOSIER, J. A.; WANG, W.; REINHART-KING, C. A. Engineered models to parse apart the metastatic cascade. **npj Precision Oncology**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41698-019-0092-3>.

HEALY, C. M.; MORAN, G. P. The microbiome and oral cancer: More questions than answers. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 89, n. December 2018, p. 30–33, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2018.12.003>.

HEARNDEN, V.; LOMAS, H.; MACNEIL, S.; THORNHILL, M.; MURDOCH, C.; LEWIS, A.; MADSEN, J.; BLANAZS, A.; ARMES, S.; BATTAGLIA, G. Diffusion Studies of Nanometer Polymersomes Across Tissue Engineered Human Oral Mucosa. **Pharmaceutical Research**, [s. l.], v. 26, n. 7, p. 1718–1728, 2009.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION. **ICH Guideline Q2(R2) – Validation of analytical procedures: scientific guideline**. 2024. Disponível em: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-q2r2-validation-analytical-procedures-scientific-guideline>. Acesso em: 9 dez. 2024.

IGNJATOVIĆ, N. L.; NINKOV, P.; SABETRASEKH, R.; USKOKOVIĆ, D. P. A novel nano drug delivery system based on tigecycline-loaded calcium phosphate coated with poly-dl-lactide-co-glycolide. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, [s. l.], v. 21, n. 1, p. 231–239, 2010.

INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional do Câncer**. Rio de Janeiro: [s. n.], 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/>. Acesso em: 19 jan. 2025.

INTERNATIONAL STANDARD ISO 10993-5. **Biological evaluation of medical devices-16:45:28 MDT No reproduction or networking permitted without license from IHS** COPYRIGHT PROTECTED DOCUMENT 16:45:28 MDT No reproduction or networking permitted without license from IHS. [S. l.: s. n.], 2009.

JERJES, W.; UPILE, T.; HAMDOON, Z.; MOSSE, C. A.; AKRAM, S.; MORLEY, S.; HOPPER, C. Interstitial PDT for vascular anomalies. **Lasers in Surgery and Medicine**, [s. l.], v. 43, n. 5, p. 357–365, 2011.

JUNQUEIRA, J. C.; JORGE, A. O. C.; BARBOSA, J. O.; ROSSONI, R. D.; VILELA, S. F. G.; COSTA, A. C. B. P.; PRIMO, F. L.; GONÇALVES, J. M.; TEDESCO, A. C.; SULEIMAN, J. M. A. H. Photodynamic inactivation of biofilms formed by *Candida* spp., *Trichosporon mucoides*, and *Kodamaea ohmeri* by cationic nanoemulsion of zinc 2,9,16,23-tetrakis(phenylthio)-29H, 31H-phthalocyanine (ZnPc). **Lasers in Medical Science**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 1205–1212, 2012.

KALLUBAI, M.; REDDY, S. P.; DUBEY, S.; RAMACHARY, D. B.; SUBRAMANYAM, R. Spectroscopic evaluation of synthesized 5 β -dihydrocortisol and 5 β -dihydrocortisol acetate binding mechanism with human serum albumin and their role in anticancer activity. **Journal of Biomolecular Structure and Dynamics**, [s. l.], v. 37, n. 3, 2019.

KARIMNIA, V.; RIZVI, I.; SLACK, F. J.; CELLI, J. P. Photodestruction of Stromal Fibroblasts Enhances Tumor Response to PDT in 3D Pancreatic Cancer Coculture Models. **Photochemistry and Photobiology**, [s. l.], v. 97, n. 2, p. 416–426, 2021.

KERAWALA, C.; ROQUES, T.; JEANNON, J. P.; BISASE, B. Oral cavity and lip cancer: United Kingdom National Multidisciplinary Guidelines. **The Journal of laryngology and otology**, [s. l.], v. 130, n. S2, p. S83–S89, 2016.

KIM, J. Bin; STEIN, R.; O'HARE, M. J. Three-dimensional in vitro tissue culture models of breast cancer - A review. **Breast Cancer Research and Treatment**, [s. l.], v. 85, n. 3, p. 281–291, 2004.

KYFFIN, J. A.; SHARMA, P.; LEEDALE, J.; COLLEY, H. E.; MURDOCH, C.; HARDING, A. L.; MISTRY, P.; WEBB, S. D. Characterisation of a functional rat hepatocyte spheroid model. **Toxicology in Vitro**, [s. l.], v. 55, 2019.

LANGER, R.; VACANTI, J. P. Tissue engineering. **Science**, [s. l.], v. 260, n. 5110, p. 920–926, 1993. Disponível em: Acesso em: 27 set. 2021.

LANZA, R.; LANGER, R.; VACANTI, J.; ATALA, A. (ed.). **Principles of tissue engineering**. 5th ed. [s. l.]: Academic Press, 2020. Disponível em: <https://www.elsevier.com/books/principles-of-tissue-engineering/lanza/978-0-12-818422-6>. Acesso em: 2 nov. 2021.

LI, Q.; CAI, T.; HUANG, Y.; XIA, X.; COLE, S.; CAI, Y. A Review of the Structure, Preparation, and Application of NLCs, PNPs, and PLNs. **Nanomaterials**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. 122, 2017.

LI, X.; ZHENG, B.-D.; PENG, X.-H.; LI, S.-Z.; YING, J.-W.; ZHAO, Y.; HUANG, J.-D.; YOON, J. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, [s. l.], v. 379, p. 147–160, 2019.

LIANG, J.; LIU, B. ROS-responsive drug delivery systems. **Bioengineering & Translational Medicine**, [s. l.], v. 1, n. 3, p. 239–251, 2016.

MALHÃO, F.; RAMOS, A. A.; BUTTACHON, S.; DETHOUP, T.; KIJJOA, A.; ROCHA, E. Cytotoxic and Antiproliferative Effects of Preussin, a Hydroxypyrrrolidine Derivative from the Marine Sponge-Associated Fungus *Aspergillus candidus* KUFA 0062, in a Panel of Breast Cancer Cell Lines and Using 2D and 3D Cultures. **Marine Drugs**, [s. l.], v. 17, n. 8, 2019.

MALLIDI, S.; ANBIL, S.; BULIN, A. L.; OBAID, G.; ICHIKAWA, M.; HASAN, T. Beyond the barriers of light penetration: Strategies, perspectives and possibilities for photodynamic therapy. **Theranostics**, [s. l.], v. 6, n. 13, p. 2458–2487, 2016.

MALLIDI, S.; KHAN, A. P.; LIU, H.; DALY, L.; RUDD, G.; LEON, P.; KHAN, S.; HUSSAIN, B. M. A.; HASAN, S. A.; SIDDIQUE, S. A.; AKHTAR, K.; AUGUST, M.; TROULIS, M.; CUCKOV, F.; CELLI, J. P.; HASAN, T. Platform for ergonomic intraoral photodynamic therapy using low-cost, modular 3D-printed components: Design, comfort and clinical evaluation. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 15830, 2019.

MANDUCA, N.; MACCAFEIO, E.; DE MARIA, R.; SISTIGU, A.; MUSELLA, M. 3D cancer models: One step closer to in vitro human studies. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 14, 2023.

MIR, M.; AHMED, N.; REHMAN, A. Recent applications of PLGA based nanostructures in drug delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, [s. l.], v. 159, p. 217–231, 2017.

MIRCIOIU, C.; VOICU, V.; ANUTA, V.; TUDOSE, A.; CELIA, C.; PAOLINO, D.; FRESTA, M.; SANDULOVICI, R.; MIRCIOIU, I. Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 11, n. 3, p. 140, 2019.

MOHAMMAD-HADI, L.; MACROBERT, A. J.; LOIZIDOU, M.; YAGHINI, E. Photodynamic therapy in 3D cancer models and the utilisation of nanodelivery systems. **Nanoscale**, [s. l.], v. 10, n. 4, p. 1570–1581, 2018.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the Oral Cavity. **Surgical Oncology Clinics of North America**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 491–508, 2015.

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

MORALES, M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade. **Ciênc. cult. (São Paulo)**, [s. l.], p. 33–36, 2008.

NAAHIDI, S.; JAFARI, M.; LOGAN, M.; WANG, Y.; YUAN, Y.; BAE, H.; DIXON, B.; CHEN, P. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 35, n. 5, p. 530–544, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.05.006>.

NAG, O. K.; NACIRI, J.; ERICKSON, J. S.; OH, E.; DELEHANTY, J. B. Hybrid Liquid Crystal Nanocarriers for Enhanced Zinc Phthalocyanine-Mediated Photodynamic Therapy. **Bioconjugate Chemistry**, [s. l.], v. 29, n. 8, p. 2701–2714, 2018.

OLEK, M.; KASPERSKI, J.; SKABA, D.; WIENCH, R.; CIEŚLAR, G.; KAWCZYK-KRUPKA, A. Photodynamic therapy for the treatment of oral squamous carcinoma—Clinical implications resulting from in vitro research. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, [s. l.], v. 27, n. March, p. 255–267, 2019.

OLUWOLE, D. O.; SARI, F. A.; PRINSLOO, E.; DUBE, E.; YUZER, A.; NYOKONG, T.; INCE, M. Photophysicochemical properties and photodynamic therapy activity of highly water-soluble Zn(II) phthalocyanines. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [s. l.], v. 203, n. li, p. 236–243, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2018.05.090>.

PAL, M.; CHEN, H.; LEE, B. H.; LEE, J. Y. H.; YIP, Y. S.; TAN, N. S.; TAN, L. P. Epithelial-mesenchymal transition of cancer cells using bioengineered hybrid scaffold composed of hydrogel/3D-fibrous framework. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1–11, 2019.

PAPALAZAROU, V.; SALMERON-SANCHEZ, M.; MACHESKY, L. M. Tissue engineering the cancer microenvironment—challenges and opportunities. **Biophysical Reviews**, [s. l.], v. 10, n. 6, p. 1695–1711, 2018.

PARÉ, A.; JOLY, A. Cancers de la cavité buccale : facteurs de risque et prise en charge. **Presse Medicale**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 320–330, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lpm.2017.01.004>.

PEREIRA, P. M. R.; BERISHA, N.; BHUPATHIRAJU, N. V. S. D. K.; FERNANDES, R.; TOMÉ, J. P. C.; DRAIN, C. M. Cancer cell spheroids are a better screen for the photodynamic efficiency of glycosylated photosensitizers. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. e0177737, 2017.

- PING, J.; PENG, H.; DUAN, W.; YOU, F.; SONG, M.; WANG, Y. Synthesis and optimization of ZnPc-loaded biocompatible nanoparticles for efficient photodynamic therapy. **J. Mater. Chem. B**, [s. l.], v. 4, n. 25, p. 4482–4489, 2016.
- PINNOCK, A.; MURDOCH, C.; MOHARAMZADEH, K.; WHAWELL, S.; DOUGLAS, C. W. I. Characterisation and optimisation of organotypic oral mucosal models to study Porphyromonas gingivalis invasion. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 16, n. 4, 2014.
- PRIMO, F. L. ; B. DA COSTA REIS, M.; A. PORCIONATTO, M.; C. TEDESCO, A. In Vitro Evaluation of Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion and Low-Level Laser Therapy on Human Skin Dermal Equivalents and Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 18, n. 22, p. 3376–3381, 2011.
- PRIMO, F. L.; DE PAULA, L. B.; DE SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Photobiostimulation on Wound Healing Treatment by ClAlPc-nanoemulsion from a Multiple-Wavelength Portable Light Source on a 3D-Human Stem Cell Dermal Equivalent. **Current Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 19, n. 30, p. 5157–5163, 2012.
- RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: Preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, [s. l.], v. 36, n. 7, p. 887–913, 2011.
- RICCI-JÚNIOR, E.; MARCHETTI, J. M. Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 310, n. 1–2, p. 187–195, 2006.
- RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 11884–94, 2015.
- ROGUIN, L. P.; CHIARANTE, N.; GARCÍA VIOR, M. C.; MARINO, J. Zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, [s. l.], v. 114, n. May, p. 105575, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.105575>.
- SAINI, R.; LEE, N.; LIU, K.; POH, C. Prospects in the Application of Photodynamic Therapy in Oral Cancer and Premalignant Lesions. **Cancers**, [s. l.], v. 8, n. 9, p. 83, 2016.
- SCHWENZER, H.; JÜHLING, F.; CHU, A.; PALLETT, L. J.; BAUMERT, T. F.; MAINI, M.; FASSATI, A. Oxidative Stress Triggers Selective tRNA Retrograde Transport in Human Cells during the Integrated Stress Response. **Cell Reports**, [s. l.], v. 26, n. 12, 2019.
- SERCOMBE, L.; VEERATI, T.; MOHEIMANI, F.; WU, S. Y.; SOOD, A. K.; HUA, S. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 6, n. DEC, p. 1–13, 2015.
- SIQUARA DA ROCHA, L. de O.; SOUZA, B. S. de F.; COLETTA, R. Della; LAMBERT, D. W.; GURGEL ROCHA, C. A. Mapping Cell-in-Cell Structures in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Cells**, [s. l.], v. 12, n. 19, p. 2418, 2023.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of

chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering C**, [s. l.], v. 33, n. 3, p. 1744–1752, 2013.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Die Pharmazie**, [s. l.], v. 65, n. 1, p. 9–14, 2010.

SONG, H.-H. G.; PARK, K. M.; GERECHT, S. Hydrogels to model 3D in vitro microenvironment of tumor vascularization. **Advanced Drug Delivery Reviews**, [s. l.], v. 79–80, n. 1, p. 19–29, 2014. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3624763/pdf/nihms412728.pdf>.

SORIANO, J.; VILLANUEVA, A.; STOCKERT, J.; CAÑETE, M. Regulated Necrosis in HeLa Cells Induced by ZnPc Photodynamic Treatment: A New Nuclear Morphology. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. 22772–22785, 2014.

SOUZA, A. G.; SILVA, I. B. B.; CAMPOS-FERNANDEZ, E.; BARCELOS, L. S.; SOUZA, J. B.; MARANGONI, K.; GOULART, L. R.; ALONSO-GOULART, V. Comparative Assay of 2D and 3D Cell Culture Models: Proliferation, Gene Expression and Anticancer Drug Response. **Current Pharmaceutical Design**, [s. l.], v. 24, n. 15, 2018.

STÁJER, A.; KAJÁRI, S.; GAJDÁCS, M.; MUSAH-EROJE, A.; BARÁTH, Z. Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts. **Dentistry Journal**, [s. l.], v. 8, n. 2, p. 43, 2020.

TAN, Y.; WANG, Z.; XU, M.; LI, B.; HUANG, Z.; QIN, S.; NICE, E. C.; TANG, J.; HUANG, C. Oral squamous cell carcinomas: state of the field and emerging directions. **International Journal of Oral Science**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 44, 2023.

TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; BELTRAME, M. **Phthalocyanines: Synthesis, Characterization and Biological Applications of Photodynamic Therapy (PDT), Nanobiotechnology, Magnetohyperthermia and Photodiagnosis (Theranostics)**. [S. l.]: Elsevier Ltd., 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-803581-8.02460-7>.

TIWARI, G.; TIWARI, R.; BANNERJEE, S.; BHATI, L.; PANDEY, S.; PANDEY, P.; SRIWASTAWA, B. Drug delivery systems: An updated review. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, [s. l.], v. 2, n. 1, p. 2, 2012.

WALLADBEGI, J.; SMITH, S. A.; GRAYSON, A. K.; MURDOCH, C.; JONTELL, M.; COLLEY, H. E. Cooling of the oral mucosa to prevent adverse effects of chemotherapeutic agents: An in vitro study. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, [s. l.], v. 47, n. 5, 2018.

WEISS, A.-V.; KOCH, M.; SCHNEIDER, M. Combining cryo-TEM and energy-filtered TEM for imaging organic core-shell nanoparticles and defining the polymer distribution. **International Journal of Pharmaceutics**, [s. l.], v. 570, p. 118650, 2019.

WOLTER, J. R.; MEYER, R. F. Sessile macrophages forming clear endotheliumlike membrane on the inside of successful keratoprosthesis. **Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology**, [s. l.], v. 222, n. 3, p. 109–117, 1985.

YURT, F.; OCAKOGLU, K.; INCE, M.; COLAK, S. G.; ER, O.; SOYLU, H. M.; GUNDUZ, C.; BIRAY AVCI, C.; CALISKAN KURT, C. Photodynamic therapy and nuclear imaging activities of zinc phthalocyanine-integrated TiO nanoparticles in breast and cervical tumors. **Chemical Biology & Drug Design**, [s. l.], v. 91, n. 3, p. 789–796, 2018.

ZIELIŃSKA, A.; CARREIRÓ, F.; OLIVEIRA, A. M.; NEVES, A.; PIRES, B.; VENKATESH, D. N.; DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; EDER, P.; SILVA, A. M.; SANTINI, A.; SOUTO, E. B. Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 16, p. 3731, 2020.