

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS
CÂMPUS DE SOROCABA

KAROLINE PAIZ CORDEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS DESINFETANTES FOTOATIVOS PARA
O CONTROLE DE SARS-CoV-2**

Sorocaba
2022

KAROLINE PAIZ CORDEIRO

**DESENVOLVIMENTO DE MATERIAIS DESINFETANTES FOTOATIVOS PARA
O CONTROLE DE SARS-CoV-2**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Materiais da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto

Sorocaba

2022

Cordeiro, Karoline Paiz.

Desenvolvimento de Materiais Desinfetantes
Fotoativos Para o Controle de SARS-CoV-2/ Karoline
Paiz Cordeiro, 2022
76 f. : il.

Orientador: Leonardo Fernandes Fraceto

Dissertação (Mestrado)-Universidade Estadual
Paulista (Unesp). Instituto de Ciência e Tecnologia,
Sorocaba, 2022

1. SARS-CoV-2. 2. Atividade fotodinâmica. 3.
Oxigênio singleto. 4. Nanopartículas. I. Universidade
Estadual Paulista. Instituto de Ciência e Tecnologia,
Sorocaba. II. Título.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE KAROLINE PAIZ CORDEIRO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE MATERIAIS, DA FACULDADE DE CIÊNCIAS - CÂMPUS DE BAURU.

Aos 28 dias do mês de novembro do ano de 2022, às 08:00 horas, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de KAROLINE PAIZ CORDEIRO, intitulada **Desenvolvimento de materiais desinfetantes ativos para controle de SARS-CoV-2**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Engenharia Ambiental / Unesp ICT Sorocaba, Prof. Dr. GERSON ARAÚJO DE MEDEIROS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Engenharia Ambiental / UNESP/Sorocaba, Prof^a. Dr^a. DANIELE RIBEIRO DE ARAUJO (Participação Virtual) do(a) Centro de Ciências Naturais e Humanas - Farmacologia / Universidade Federal do ABC. Após a exposição pela mestrande e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final Aprovada.

Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. LEONARDO FERNANDES FRACETO

Leonardo Fernandes
Fraceto:20633995819

Assinado de forma digital por
Leonardo Fernandes
Fraceto:20633995819
Dados: 2022.11.28 09:14:11 -03'00'

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto
(Orientador)

Assinatura

Prof.^a Dra. Daniele Ribeiro de Araújo - (UFABC)

Assinatura

Prof. Dr. Gerson Araújo de Medeiros (Unesp)

Assinatura

Dr. Jhones Luiz de Oliveira (FCAV)

Assinatura

Dra. Estefânia V. Ramos Campos (Unesp)

Assinatura

Sorocaba, 28 de Novembro de 2022

Dedico este trabalho aos meus célebres pais, ao meu companheiro Matheus, aos cientistas brasileiros, à toda população mundial e às vidas lastimavelmente acometidas pela COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço à Deus pela minha vida, por me amar incondicionalmente, por me proporcionar a realização de todos os meus sonhos acadêmicos, por permitir que eu seja instrumento de captação e transformação do ensino da ciência.

Aos meus pais por todo o apoio e consolidação de minha vida e por serem tão compreensivos nos meus momentos de ausência por dedicação ao mestrado.

Ao meu amor e companheiro de vida, Matheus W. A. da Silva, por não me deixar desistir nos momentos de dor e por me assegurar com toda sua ternura e carinho.

Aos meus antigos professores de educação básica, educação técnica e superior, que puderam me alicerçar aos caminhos percorridos por mim até o presente momento.

Ao Dr. Filipe Vilela (Heriot Watt University - UK) por sintetizar e me fornecer os compostos fotoativos.

Às minhas fiéis amigas Dra. Camila A. O. M. Arakaki, Profa. Stephanie V. Bastos e Ms. Juliane B. de Moura por me auxiliarem psicologicamente e emocionalmente durante todo esse período de mestrado. Sem o afago de vocês, eu não teria suportado.

Aos meus parceiros de laboratório, Dra. Estefânia V. R. Campos e Dr. Anderson E. S. Pereira, pelos ensinamentos, pela paciência com minhas dificuldades, pelo incentivo e por todo o auxílio com as demandas da pós-graduação.

À todas as pessoas que de certa forma participaram desse processo, me apoiando e estimulando-me a prosseguir.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Leonardo Fernandes Fraceto pela honra de ter sido sua orientanda e por ter me confiado atuar nesse projeto.

Aos parceiros do Laboratório de Nanotecnologia Ambiental da Unesp de Sorocaba por todas as conversas divertidas e de crescimento profissional.

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

CORDEIRO, K.P. **Desenvolvimento de materiais desinfetantes fotoativos para o controle de sars-cov-2.** 2022. Dissertação (Mestre em Ciência e Tecnologia de Materiais) - Universidade Estadual Paulista - UNESP, Faculdade de Ciências, Sorocaba - SP. 2022.

Resumo

A fim de desenvolver novos desinfetantes capazes de desativar a longo prazo os agentes patogênicos, incluindo o coronavírus (SARS-CoV-2), presentes em múltiplas superfícies, o presente trabalho mostra um método de síntese de dois tipos de sistemas carreadores, chamados de nanocápsulas e nanoemulsões que, associadas com radiação visível, oxigênio molecular e um fotossensibilizador (PS), atuam fotodinamicamente sobre os agentes patogênicos. A metodologia neste estudo incluiu o preparo e a caracterização de nanopartículas através da avaliação da estabilidade relacionada com os seus tamanhos, polidispersão, potencial zeta e morfologia, utilizando técnicas como dispersão de luz dinâmica (DLS) e microscopia de força atômica (AFM), bem como estudos de degradação pelo método de espectrofotometria UV-Vis. Através das análises de DLS, os resultados mostraram que o diâmetro médio das nanopartículas poliméricas era de 340 ± 4 nm para nanopartículas controle (NP_CTL) e 375 ± 6 nm para as nanopartículas com_PS (NPs_PS), apresentando um sistema monodisperso com valores de PDI $< 0,170$ e potencial zeta negativo de $-31 \pm 0,1$ mV e $-31 \pm 0,6$ mV para NPs_CTL e NPs_PS, respectivamente, demonstrando a estabilidade das nanopartículas no período de 90 dias. Enquanto as nanoemulsões (NE) expressaram um tamanho de 253 ± 3 e 252 ± 3 nm, para NEs_CTL e NEs_PS, respectivamente, sendo um sistema razoavelmente estável com valores IDP $< 0,2$ sem formação de agregados e potencial zeta negativo de $-35 \pm 0,3$ mV para NE_CTL e $-35 \pm 0,9$ mV para NE_PS. Os resultados de estudos de degradação indicam que o fotossensibilizador Diphenyl BTZ 1-6 (4,7- diphenylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole) (Diph-BTZ) induz a formação de espécies reativas de oxigênio, e foi capaz de degradar a molécula de azul de metileno (molécula modelo). Além disso, as nanopartículas foram eficientes na proteção do fotossensibilizador, prolongando a sua vida útil ao longo do tempo, demonstrando que ao aumentar a sua persistência, quanto maior a quantidade de oxigênio reativo produzido, conseguindo assim um elevado tempo de atividade de esterilização em diferentes tipos de superfícies.

Palavras-Chave: SARS-CoV-2, atividade fotodinâmica, oxigênio singleto, nanopartículas.

Abstract

To develop new disinfectants capable of long-term inactivation of pathogens, including coronavirus (SARS-CoV-2), present on multiple surfaces, the present work shows a method for synthesizing two types of carrier systems, called nanocapsules and nanoemulsions that, associated with visible radiation, molecular oxygen and a photosensitizer (PS), act photodynamically on pathogens. The methodology in this study included the preparation and characterization of nanoparticles by evaluating their size-related stability, polydispersity, zeta potential, and morphology using techniques such as dynamic light scattering (DLS) and atomic force microscopy (AFM), as well as degradation studies by UV-Vis spectrophotometry method. Through DLS analyses, the results showed that the average diameter of the polymeric nanoparticles was 340 ± 4 nm for control nanoparticles (NP_CTL) and 375 ± 6 nm for the nanoparticles with_PS (NPs_PS), presenting a monodisperse system with PDI values < 0.170 and negative zeta potentials of -31 ± 0.1 mV and -31 ± 0.6 mV for NPs_CTL and NPs_PS, respectively, demonstrating the stability of the nanoparticles over the 90-day period. While the nanoemulsions (NE) expressed a size of 253.3 and 252.3 nm, for NEs_CTL and NEs_PS, respectively, being a reasonably stable system with IDP values < 0.2 with no aggregate formation and negative zeta potential of -35 ± 0.3 mV for NE_CTL and -35 ± 0.9 mV for NE_PS. The results of degradation studies indicate that the photosensitizer Diphenyl BTZ 1-6 (4,7- diphenylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole) (Diph-BTZ) induces the formation of reactive oxygen species, and was able to degrade the methylene blue molecule (model molecule). Furthermore, the nanoparticles were efficient in protecting the photosensitizer, extending its lifetime over time, demonstrating that by increasing its persistence, the greater the amount of reactive oxygen produced, thus achieving a high sterilization activity time on different types of surfaces.

Keywords: SARS-CoV-2, photodynamic activity, singlet oxygen, nanoparticles.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Doenças emergentes e reemergentes	11
1.1.1. Diferenças entre pandemia, epidemia, sindemia, endemia e surto	12
1.2. Os Coronavírus	14
1.2.1. A estrutura dos coronavírus	16
1.2.2. Tipos de coronavírus	17
1.3. SARS-CoV-2	18
1.3.1. Origem do SARS-CoV-2	19
1.3.2. Grau de virulência	21
1.3.3. Resistência e tempo de meia vida em superfícies	23
1.3.4. Métodos de proteção e assepsia	25
1.4. Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (IFDA)	27
1.4.1. Fotossensibilizadores (FS)	29
1.4.1.1. Interações de FS com diferentes tipos de microrganismos	30
1.4.2. Oxigênio Singleto	32
1.4.3. Matriz de radiação	33
1.4.4. Processos da IFDA e mecanismos de reação	34
1.5. Nanociência e Nanotecnologia	36
1.5.1. Sistemas nanocarreadores	37
1.5.2. Polímeros biodegradáveis	41
1.5.3. Métodos de nanoencapsulação	42
2. OBJETIVOS	45
2.1. Objetivos Específicos	45
3. MATERIAIS E MÉTODOS	46
3.1. Materiais	46
3.2. Metodologia	46
3.2.1. Preparação das formulações nanoestruturadas	46
3.2.2. Nanopartículas poliméricas	47
3.2.3. Nanoemulsões	47
3.2.4. Curva de absorção e calibração do FS Diph-BTZ	48
3.2.5. Avaliação da estabilidade das nanoestruturas por <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	48

3.2.6. Avaliação morfológica das nanoestruturas por <i>Atomic Force Microscopy</i> (AFM)	49
3.2.7. Ensaios de degradação por espectroscopia	50
3.2.7.1. Degradação do Fotossensibilizador Diph-BTZ (FS)	50
3.2.7.2. Degradação do Azul de Metileno (AM)	50
3.2.7.3. Degradação do Azul de Metileno + Fotossensibilizador (AM+FS)	50
3.2.7.4. Degradação da NP PCL_FS e NE_FS	51
3.2.7.5. Degradação da NP PCL CTL e NE CTL dissolvidas em solução de FS	51
3.2.7.6. Degradação da NP PCL_FS e NE_FS dissolvidas em AM	51
3.2.7.7. Degradação da NP PCL CTL e NE CTL dissolvidas em solução de AM	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.1. Síntese e caracterização das nanopartículas	52
4.1.1. Estabilidade das partículas nanoestruturadas e função do tempo	52
4.1.2. Tamanho e morfologia das nanopartículas avaliadas no AFM	54
4.2. Caracterização do fotossensibilizador Diph-BTZ	55
4.2.1. Curva de absorção e calibração do FS Diph-BTZ	55
4.3. Fotodegradação das partículas fotossensíveis e nanopartículas	56
4.3.1. Degradação do Azul de Metileno + Fotossensibilizador (AM+FS)	56
4.3.2. Degradação das NP PCL_FS e NE_FS comparadas ao FS isolado	58
4.3.3. Degradação das nanopartículas diluídas em água comparadas às diluídas em azul de metileno	60
4.3.4. Degradação das NP PCL CTL + FS e NE CTL + FS comparadas ao FS isolado	61
4.3.5. Degradação das NP PCL CTL + AM e NE CTL + AM comparadas ao AM isolado	62
5. CONCLUSÕES	64
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

1.1. Doenças Infecciosas Emergentes e Reemergentes

Segundo a definição da *Center for Disease Control and Prevention* (CDC, Doenças Infecciosas Emergentes e Reemergentes são classificadas como patologias inéditas (emergentes) ou já conhecidas (reemergentes), que vem acometendo humanos nas duas últimas décadas advertindo aumentar nos próximos anos. Esse termo procedeu a *Teoria da Transição Epidemiológica*, que possuía ideias hegemônicas para compreender as morbidades e mortalidades mundiais (LUNA, 2002) (GRISOTTI, 2007).

No sentido de assimilar as possíveis causas determinantes a cerca desse assunto, o autor LUNA categorizou alguns fatores presumidos para embasar essas questões, dividindo em sete (07) grupos diferentes, sendo eles:

- Fatores demográficos;
- Fatores sociais e políticos;
- Fatores econômicos;
- Fatores ambientais;
- Fatores relacionados ao desempenho do setor da saúde;
- Fatores relacionados às mudanças e adaptação dos microrganismos e
- Manipulação de microrganismos com vistas ao desenvolvimento de armas biológicas.

Desse modo, é importante ressaltar que há diversas causas que propiciam a atividade microbiana e o surgimento de novas infecções, como por exemplo: O aumento populacional em regiões centrais com aglomerações e disseminação de doenças; precariedade nos serviços de saneamento e de tratamento de resíduos sólidos favorecendo o surgimento de bactérias como a *Vibrio Cholerae* causadora da Cólera; emigração e imigração de refugiados de zonas de guerras oportunizando o aparecimento de novas doenças advindas de outros territórios; importações e exportações internacionais de variadas mercadorias propiciando doenças emergentes como os hantavírus, *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* e entre outras (LUNA, 2002). Além disso, fatores como taxa de mutação e virulência dos microrganismos, podem contribuir para um cenário pandêmico ou epidêmico oferecendo riscos irremissíveis para a população.

Portanto, entender as razões das doenças infecciosas emergentes e reemergentes, auxiliam na reflexão de alternativas que revertam situações insatisfatórias e/ou assegurem a humanidade dessas enfermidades.

1.1.1. Diferenças entre epidemia, endemia, surto, pandemia e sindemia

Estima-se que os microrganismos patogênicos acompanham a evolução e vida da humanidade, desde os primeiros hominídeos ancestrais do homem moderno. Alguns vírus e protozoários, como o *Papilomavírus Humano (HPV)* e a *Tênia* por exemplo, representam uma pequena porção dentre muitos espécimes que foram transmitidos para outros animais e que através do processo de mutagênese adquiriram resistência e alterações ao meio (UJVARI,2008).

Por consequência, a propagação de doenças pode atingir patamares irreduzíveis e alarmantes, acarretando um conjunto de fatores resultantes a uma calamidade pública de adoecimento, padecimento e adversidades que envolvem a camada social, econômica, sanitária, educacional e entre outras. Em virtude, de classificar a dimensão das enfermidades contaminantes à população, termos como: pandemia, sindemia, epidemia, endemia e surto, são comumente utilizados na epidemiologia médica.

Epidemia

A *Center for Disease Control and Prevention (CDC)*, foi criada em 1946 nos Estados Unidos da América, com o objetivo de criar contenções para prevenir a malária e sua expansão ao território norte-americano. Sua constituição melhorou significativamente a saúde pública, tornando-se a principal agência de promoção, prevenção e preparação da saúde dos *EUA* (“Doenças infecciosas emergentes | NIOSH | CDC”, 2021).

À vista disso, foi gerado alguns conceitos para compreender as proporções de doenças emergentes e reemergentes. Tendo como base a definição da instituição, epidemia concerne ao aumento esperado ou repentino na quantidade de casos de uma doença, que está acima do expectável para a população de uma determinada área, sendo essas: bairro, região e população (INTERMOUNTAIN HEALTHCARE, 2020).

Endemia

É caracterizada pela presença constante e/ou predominante de uma doença ou agente patológico em uma habitual população de determinadas áreas geográficas. Sendo assim, o desenvolvimento e reemergência dessas mazelas, são esperadas em regiões conhecidas por apresentarem alguns vetores (REZENDE,1998). Porém, ao contrário da epidemia, a endemia refere-se a níveis expectados de contaminação (INTERMOUNTAIN HEALTHCARE, 2020).

Surto

Refere-se ao acréscimo abrupto e imprevisível na quantidade de casos de uma doença em uma região específica e limitada. Podendo ser considerado como um episódio aperiódico ou não ordinário (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

Pandemia

Elucida o conceito de ser analogamente uma epidemia disseminada por vastos territórios como, países e continentes, cuja ação contagiosa afeta substancialmente uma quantidade de pessoas (INTERMOUNTAIN HEALTHCARE, 2020).

Etimologicamente o termo “pandemia” é oriundo do grego com união dos dois prefixos neutros “*pan*” e “*demos*” que significa “Todo o povo” ou “Povo inteiro. Platão, utilizou-a pela primeira vez em seu livro denominado “Das Leis”, mencionando qualquer evento capaz de alcançar a população de forma íntegra. No entanto, somente a partir do século XVIII que a expressão foi incorporada definitivamente ao glossário médico relacionando o adjetivo a patologias epidêmicas e de grande espargimento, perdurando até os dias atuais (REZENDE, 1998).

Sindemia

A palavra sindemia foi proferida pela primeira vez no ano de 1990, pelo antropólogo-médico estadunidense Marrill Singer, retratando a junção de termos como “pandemia” e “sinergia”, com o intuito de explicar os danos que uma interação de duas ou mais doenças, podem ocasionar na população (FIOCRUZ,2020).

Pesquisadores elucidam que infortúnios causados por uma pandemia, podem potencializar o agravamento de outras doenças pré-existentes ou interromper tratamentos médicos contínuos e, portanto, provocar um cenário de calamidade com perigos e riscos inestimáveis (NETO, 2021).

É fatídico que os eventos pandêmicos oferecem nocividades além dos riscos biológicos, como em atual exemplo, o caso do novo coronavírus causador da doença

COVID-19, que há mais de 24 meses está impossibilitando a realização de atividades sucessivas da forma habitual da convivência humana. Em análise interpessoal desta autora, a questão levantada por Singer, acerca do termo “Sindemia”, pode ser interpretada por dois vieses distintos, sendo eles: *Fatores contribuintes que resultam na pandemia* ou *Fatores contribuintes que são resultados da pandemia*.

Os **fatores contribuintes que resultam na pandemia**, pode ser analisado pela sinergia de elementos sociais, econômicos, políticos e ambientais que contribuem para o início de uma epidemia e em casos incontroláveis, uma consequente pandemia. Dado aos fatos que uma carência de higienização pública e/ou social podem acarretar a emergência ou reemergência de enfermidades; deficiência de políticas públicas que atuem concomitante à ciência a fim de estudar previamente meios contaminantes; destruição ambiental e florestal que resultam em uma proliferação de organismos e microrganismos e entre outros.

Já os **fatores contribuintes que são resultados da pandemia**, podem ser examinados pela consequência de alguns fatos que foram listados acima, relacionando-os entre si e gerando novas doenças psiquiátricas, por exemplo, bem como no agravamento de outras doenças pré-existentes e/ou crônicas, que tiveram seus tratamentos interrompidos ou cessados e que possivelmente poderão ser fatores críticos em caso de combinação dessas mazelas com outra enfermidade pandêmica.

1.2. Os coronavírus

Os coronavírus são espécies de vírus pertencentes a subfamília *Coronaviridae*, cujo nome está intrinsicamente relacionado a presença de proteínas, geradoras dos picos superficiais ao vírus, análogos a uma coroa solar (SIMABUCO et al., 2020).

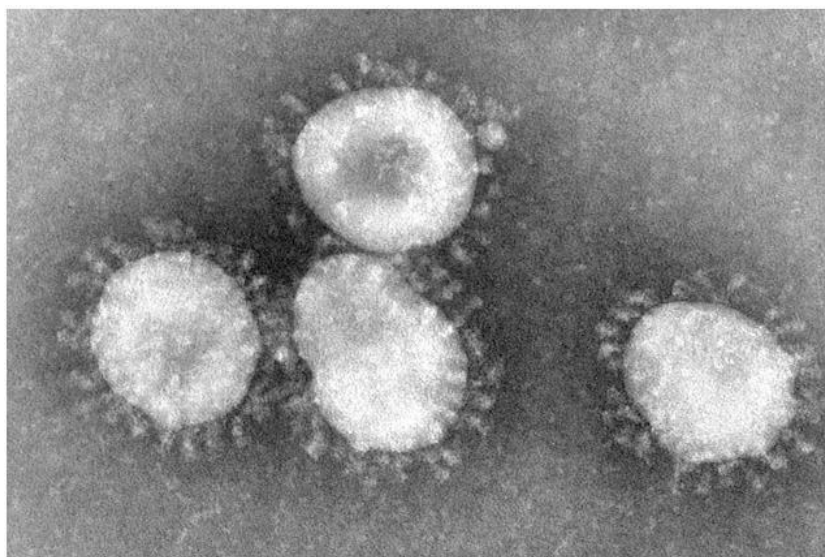
São vírus de genoma RNA e, portanto, possuem um sequenciamento básico, caracterizado como fita simples. Contudo, são um dos principais causadores de infecções no trato respiratório de animais e aves, favorecendo preponderantemente o conjunto de morbidades e mortalidades populacionais a nível mundial (NOBRE et al., 2014; LANA et al., 2020).

Esse tipo de patógeno, foi descoberto primariamente em aves no ano de 1937, sendo determinado como um microrganismo ameaçador e de alta periculosidade, que contribuiu a um quadro de bronquite aguda em pássaros (FELMAN, 2021). Somente

em 1964 o coronavírus humano foi identificado por meio de uma amostra coletada do resfriado de um jovem paciente (GOZZO, 2020).

Os principais dados e informações obtidos ao longo dos anos em relação ao coronavírus, deve-se à cientista escocesa Dra. June Almeida, que foi pioneira desses estudos, descobrindo e compartilhando seus conhecimentos sobre virologia, com o mundo e toda comunidade científica. Em consequência, Almeida obteve um dado referencial da primeira imagem do vírus, fotografado através de um microscópio eletrônico, como mostra a **figura 1**, corroborando para as análises e entendimento do agente patológico (COMBS, 2020).

Figura 1 - Coronavírus fotografados por meio de um microscópio eletrônico



Fonte: Retirada do site National Geographic, 2020. Disponível em:

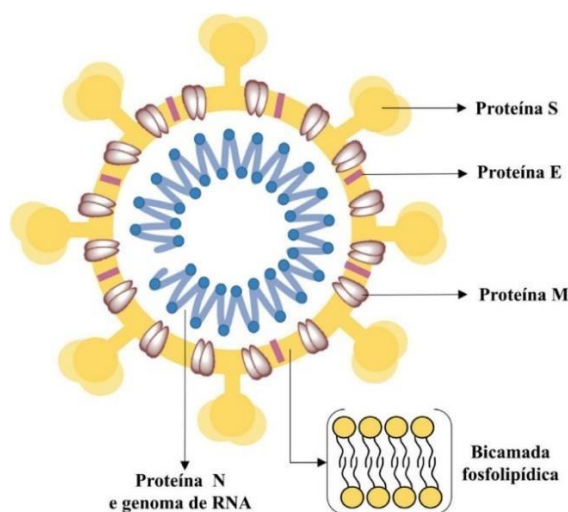
<<https://www.nationalgeographic.com/history/article/june-almeida-discovered-coronaviruses-decades-ago-little-recognition>> Acesso em: 01 mar. 2021

Nada obstante, ao final do ano de 2002 a China foi dominada por uma epidemia de um tipo de coronavírus denominado como SARS-CoV, do qual apresenta sintomas similares ao de um resfriado ou gripe comum e que foi contido a partir do ano de 2004, atingindo letalidade de aproximadamente 10% (LANA et al., 2020). No entanto, em 2012 o Oriente Médio também foi tomado por um novo tipo de coronavírus, nomeado como MERS-CoV ou popularmente conhecido como Síndrome Respiratória do Oriente Médio, com letalidade de aproximadamente 34% (OMS, 2019).

1.2.1. A estrutura dos coronavírus

Os coronavírus são considerados microrganismos de genoma simples, no qual dispõem de um envelope de aspecto arredondado com dimensões variáveis dentre 80 a 120 nm e, todos os tipos apresentam genes virais contendo 04 proteínas estruturais principais, sendo elas: nucleocapsídeo (N), pico (S), proteína de membrana (M) e pequena proteína de membrana (E) conforme mostra a figura 2, diferindo entre eles em pequenos aspectos (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005).

Figura 2 - Estrutura de um coronavírus da espécie SARS-CoV-2



Fonte: LIMA et al., 2020.

Cada parte estrutural dos coronavírus possuem determinadas funções que irão contribuir para sua sustentação, sobrevivência e replicação. Resumidamente, a proteína N é conhecida como um capsídeo helicoidal responsável por agregar o genoma RNA do CoV formando o nucleocapsídeo. Já a glicoproteína S atua na criação de peplômeros (picos) superficiais ao microrganismo e na entrada e propagação do vírion à célula hospedeira (WEISS; NAVAS-MARTIN, 2005; SCHOEMAN; FIELDING, 2009).

No entanto, a proteína M é a substancial motivadora à formação morfológica e montagem do vírion. Enquanto, a proteína E exerce o papel de multiplicação viral, desempenhando o tráfego intracelular e na penetração da célula infectada (SCHOEMAN; FIELDING, 2009). Um dado CoV é capaz de contaminar uma célula-alvo através de fusão da membrana citoplasmática ou endossômica, decorrendo uma liberação de RNA mensageiro ao interior do citoplasma hospedeiro para uma posterior reprodução (XIA et al., 2020).

Apesar das proteínas essenciais cumprirem uma significativa ação, as demais proteínas não essenciais também são componentes críticos para a maquinaria de replicação do RNA, transcrição e neutralização da imunidade inata do hospedeiro (QIU; XU, 2020).

1.2.2. Tipos de coronavírus

Os coronavírus são agentes patológicos causadores de doenças de alto e médio risco em grande parte da população mundial e que em decorrência dos anos vem ganhando grande foco dos pesquisadores, por apresentarem mutações e virulências elevadamente perigosas à saúde humana.

Em virtude, da descoberta do primeiro coronavírus humano em 1964 e pelo seu grau de relevância em toda área da saúde, a diligência em fundamentar essa nova evidência analisando o patógeno, como também em seu cultivo, possibilitou que novas cepas do vírus fossem encontradas e investigadas em prestígio da ciência (JAISWAL; SAXENA, 2020).

Portanto, mediante aos esforços dos cientistas envolvidos e todo o conjunto de informações reunidas, atualmente a subfamília *Coronaviridae* está segmentada em quatro (04) gêneros, sendo eles: Alfa (α) coronavírus, Beta (β) coronavírus, Gama (γ) coronavírus e Delta (δ) coronavírus, sendo entendido que os alfacoronavírus e betacoronavírus infectam principalmente os mamíferos. (JAISWAL; SAXENA, 2020; SIMABUCO et al., 2020; CUI; LI; SHI, 2019).

Contudo, torna-se notório que os coronavírus estão presentes entre os seres humanos e outros animais e aves, que são infectados por diferentes tipos desses agentes patológicos ou os mesmos, já que algumas estirpes são consideradas zoonóticas. À vista disso, é possível certificar que há sete (07) tipos de coronavírus humanos conhecidos conforme é mostrado na **tabela 1**.

Tabela 1 - Tipos conhecidos de coronavírus humanos

Espécie	Gênero	Risco
229E	Alfa	Leve/Moderado
NL63	Alfa	Leve/Moderado
HKU1	Beta	Leve/Moderado
OC43	Beta	Leve/Moderado
MERS-CoV	Beta	Grave
SARS-CoV	Beta	Grave
SARS-CoV-2	Beta	Grave

Fonte: Elaborada pela autora com base em Jaiswal e Saxena, 2020.

Com base aos dados da *Center for Disease Control and Prevention – CDC* (2020), considera-se que quatro (04) tipos desses coronavírus humanos listados na tabela 1, sendo: 229E, NL63, HKU1 e OC43, frequentemente infectam pessoas de todo o mundo e apresentam sintomas conhecidos e ordinários da gripe em pacientes imunocompetentes, ou seja, pessoas que possuam um organismo capaz de produzir anticorpos em resposta aos microrganismos patógenos (BELASCO; FONSECA, 2020).

1.3. O SARS-CoV-2

Ao final do ano de 2019, um patógeno desconhecido havia se proliferado e infectado diversos habitantes da cidade de Wuhan, província de Hubei, na China, manifestando sintomas semelhantes a uma pneumonia viral de alta transmissibilidade e caracterizada como uma enfermidade potencialmente fatal (HU et al., 2020).

Em vista disso, as análises epidemiológicas realizadas nos primeiros pacientes contaminados, apontavam que a maioria possuía uma correlação de trabalho e/ou venda de produtos com frutos do mar, aves e animais selvagens de um mercado localizado no centro de Wuhan e denominado como “*Huanan Seafood Wholesale Market*” (HU et al., 2020; WU, et al., 2020).

Com o intuito de identificar e compreender a procedência desse agente patológico, pesquisadores chineses realizaram um sequenciamento genômico de

amostras coletadas de pacientes contaminados, através dos fluídos de lavagem broncoalveolar (HU et al., 2020) e de fezes (ZHOU et al., 2020), do qual revelou a existência de um vírus categorizado a subfamília dos *Coronaviridae*, sendo classificado como betacoronavírus e primariamente nominado como 2019-nCoV (CORMAN et al., 2020).

Posteriormente, foi reconhecido que o novo coronavírus possui uma grande relação genômica com a espécie viral SARS-CoV, principal causadora da doença Síndrome Respiratória Aguda Grave (CORMAN et al., 2020). Portanto, em 11 de fevereiro de 2020 o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus – ICTV, anunciou que a nomenclatura oficial do patógeno seria SARS-CoV-2 e na mesma data a Organização Mundial da Saúde declarou o COVID-19 como o nome oficial da doença oriunda do vírus (OMS, 2020).

Com base em ensaios científicos, notou-se que a semelhança do SARS-CoV-2 com os genomas de outros coronavírus como o SARS-CoV e MERS-CoV, era de 79% e 50%, respectivamente (HU et al., 2020). Deste modo, a análise dos quatro genes estruturais, sendo eles: pico (s), envelope (e), membrana (m) e nucleocapsídeo (n), demonstraram que o novo coronavírus apresenta mais de 90% de identidade de aminoácidos com o SARS-CoV, em exceção do pico (s) (HU et al., 2020).

Diante de toda situação ameaçadora para a saúde de toda a humanidade e os riscos de contágios incontroláveis, a Organização Mundial da Saúde comunicou no dia 11 de março de 2020, que o coronavírus SARS-CoV-2, principal causador da doença infecciosa COVID-19 passou a ser caracterizado como pandêmico (OMS, 2020).

1.3.1. A origem do SARS-CoV-2

A sinantropia é um potencial fator de preocupação ambiental e sanitária da modernidade, dado que, alguns animais instalam-se em territórios habitados predominantemente por humanos, usufruindo de alguns alimentos e condições desfavoráveis para a espécie. Sendo assim, a evasão de seus habitats naturais, modificação da dieta e adaptação aos costumes humanos, corrobora para uma série de danos, ressaltando como fator de risco as zoonoses.

Em exemplo disso, grande parte das doenças emergentes e reemergentes do mundo, como o HIV, MERS-CoV, SARS-CoV e o recém-descoberto SARS-CoV-2,

devem-se por microrganismos patológicos de natureza zoonótica, por vezes, possuindo alta letalidade e virulência (MURAKAMI et al., 2020).

No entanto, cientistas buscam estudar alguns parâmetros etiológicos sobre o novo vírus, a fim de mitigar a sua propagação e conhecer sua patogenicidade, tendo em vista, a investigação de alguns animais oriundos da área de Wuhan, como por exemplo algumas espécies de morcegos e pangolins, dos quais, naturalmente abrigam algumas estirpes de coronavírus (ZHENG, 2020).

Pesquisadores sugerem que possivelmente a origem do SARS-CoV-2, está atrelada a alguns animais denominados como hospedeiros naturais e hospedeiros intermediários (HU et al., 2020), sendo estudadas algumas espécies de morcegos como *Rhinolophus cornutus* (MURAKAMI et al., 2020); *Rhinolophus sinicus* (ZHOU et al., 2020) e *Rhinolophus affinis* (ZHOU; YANG, 2020).

À vista disso, o coronavírus 'RaTG13' presente na espécie de morcego *Rhinolophus affinis* da província de Yunnan, China, representa até o momento o congênere mais próximo do SARS-CoV-2, evidenciando uma sequência genômica total de 96,2%, divergindo apenas o pico do Receptor Binding Domain (RBD) (ZHOU; YANG, 2020) (ZHENG, 2020).

Entretanto, apesar das similaridades de 'RaTG13' com a sequência genômica de SARS-CoV-2, esses dados ainda não asseguram que a origem do novo vírus tenha sido advinda dos morcegos, mas sim que eles possam ser seu hospedeiro natural com possível transmissão para um outro animal (ANDERSEN et al., 2020), oportunizando o estudo em torno de outras espécies.

Em busca de maiores resultados, pesquisadores exploraram genomas de coronavírus de alguns pangolins malaio (*Manis javanica*) de Guangxi e Guangdong e obtiveram resultados correspondentes a 85,5% a 92,4% de similaridade de sequência genômica com o SARS-CoV-2, equivalendo a duas sub-linhagens de vírus relativo ao novo coronavírus e, portanto, ressaltando a hipótese de que pangolins possam atuar como hospedeiros intermediários do patógeno (LAM et al., 2020).

Outras teorias plausíveis que embasam as explicações sobre a emergência do SARS-CoV-2, apresentam três suposições como: a) seleção natural em um hospedeiro antes da transferência zoonótica, que presume a otimização/evolução do RBD do vírus para a sua associação a enzima receptora humana ACE2 de forma eficiente; b) seleção natural em humanos após a transferência zoonótica, que

pressupõe a adaptação de sobrevivência do vírus às condições genéticas dos seres humanos, ou seja, a seleção natural só ocorreria de fato, quando o vírus estivesse em contato com o organismo humano e c) seleção durante a passagem, que explica as mutações do vírus durante a passagem às células humanas (ANDERSEN et al., 2020).

1.3.2. Grau de virulência

Sabe-se que o SARS-CoV-2 é um potente agente etiológico causador da doença COVID-19, sendo reconhecido por suas características altamente virulentas e transmissíveis. No entanto, há diversos fatores que corroboram para esse cenário de infectividade populacional, dos quais necessitam serem compreendidos e estudados com maior vigor.

As autoridades internacionais da saúde como a OMS e a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), apontam que os principais meios de transmissão do vírus são por contato, gotículas, pelo sangue, aerossóis, fecal-oral, fômites, de mãe para filho e de animal para humanos. Tendo isso em vista, é admissível a gravidade que as formas de contágio pelo patógeno podem oferecer, demonstrando uma parcela dos fatores contribuintes para a propagação do vírus (OPAS, 2020).

Analisando as condições sobre a interação do vírus e seu desenvolvimento no hospedeiro, estudos indicam que diversas estruturas genômicas do SARS-CoV-2, atuam favoravelmente para sua reprodução e sobrevivência ao meio. À vista disso, o microrganismo utiliza o seu RBD da proteína *spike*, para associar-se ao receptor ACE2 da célula humana (SHENG et al., 2020), acessando internamente a célula através dessa enzima (SARKAR; GUHA, 2020) para replicar seu genoma e transcrever seus genes (HILLEN et al., 2020).

Pesquisas sugerem que essa interação do RBD do vírus com os domínios de ligação no receptor ACE2 humano, possuem grande afinidade que capacita os SARS-CoVs para infecção cruzada, podendo ser um dos fatores críticos e determinantes para compreender a virulência desse agente patógeno. Visto que, a invasão e replicação viral ocorre por meio da penetração celular, adaptabilidade e sistema imunológico do hospedeiro (SARKAR; GUHA, 2020).

No fundamento da morfogênese do SARS-CoV, foi certificado que sua proteína do envelope (E) atua na interação do vírus com o hospedeiro, na replicação e na patogenicidade. Do mesmo modo, foi constatado que essa proteína E, condiciona

significativamente a ativação do inflamassoma e a inflamação parênquima pulmonar, resultando em edemas que levam à Síndrome Respiratória Aguda Grave (DEDIEGO et al., 2014). Portanto, esses dados sobre o SARS-CoV podem colaborar para uma melhor assimilação da morfogênese do SARS-CoV-2, já que compartilham 79% de similaridade genômica (HU et al., 2020).

Em contrapartida, estudiosos investigaram que as tempestades de citocinas podem ser causas potenciais no agravamento da doença COVID-19, pois a liberação excessiva de citocinas pró-inflamatórias ativa uma intensa produção de citocinas no interior dos pulmões, ocasionando a falência de órgãos vitais (LI et al., 2021). Desse modo, fica explícito que há diversas condições intensificadoras para sobrevivência e resistência do vírus em hospedeiros.

Todavia, também existe a ocorrência das mutações do SARS-CoV-2, dado que, todos os tipos de vírus sofrem alterações em sua sequência genômica com variáveis temporais, ambientais e naturais através da seleção natural (HARVEY et al., 2021). As mutações do SARS-CoV-2 acontecem na proteína pico (S), principal estrutura responsável por ligar-se aos receptores da célula do hospedeiro efetivando a contaminação (BANOUN, 2021). Portanto, algumas variantes desse vírus podem apresentar mudanças na propriedade viral como, o aumento da infecciosidade, transmissibilidade, redução da eficácia de tratamentos médicos e de vacinas (OMS, 2021).

À fim de otimizar o entendimento populacional relacionado aos nomes, meios de prevenção, periculosidade e monitoramento de novas variantes do SARS-CoV-2, a OMS anunciou no dia 31 de maio de 2021, uma classificação que nomeia todas as mutações consideradas Variantes de Preocupação (VP) e Variantes de Interesse (VI) com letras gregas, conforme demonstra a tabela 2 e 3.

Tabela 2 - Definições das Variantes de Preocupação do SARS-CoV-2

Rótulo da OMS	Linhagens do sistema Pango	Data de designação
Alfa	B.1.1.7	18 de dezembro de 2020
Beta	B.1.351 B.1.351.2 B.1.351.3	18 de dezembro de 2020
Gama	P.1 P.1.1 P.1.2	11 de janeiro de 2021
Delta	B.1.617.2 AY.1 AY.2 AY.3	VI: 04 de abril de 2021 VP: 11 de maio de 2021
Ômicron	B.1.1.529	26 de novembro de 2021

Fonte: Adaptado de OMS, 2021

Tabela 3 - Definições das Variantes de Interesse do SARS-CoV-2

Rótulo da OMS	Linhagens do sistema Pango	Data de designação
Eta	B.1.525	17 de março de 2021
Iota	B.1.526	24 de março de 2021
Kappa	B.1.617.1	04 de abril de 2021
Lambda	C.37	14 de junho de 2021

Fonte: Adaptado de OMS, 2021.

Aliando todos esses elementos que foram citados, é verídico que agentes patógenos emergentes e reemergentes, dos quais, possuem alta transmissibilidade, patogenicidade, adaptabilidade e virulência, podem ocasionar um cenário pandêmico e com diversos impasses para a saúde global.

1.3.3. Resistência e tempo de meia vida em superfícies

Sabe-se que o novo betacoronavírus SARS-CoV-2, possui uma baixa taxa de mortalidade (~6,8%) quando comparado a outros coronavírus zoonóticos como, SARS-CoV-1 e MERS-CoV que apresentam letalidade de 10,9% e 34,4%,

respectivamente (ABOUBAKR; SHARAFELDIN; GOYAL, 2020). No entanto, o patógeno dispõe de um elevado índice de transmissão, decorrente de suas múltiplas vias contagiosas, levando em evidência sua intensa contaminação de superfícies.

Embora as gotículas respiratórias de pacientes infectados por CoVs, sejam consideradas a principal via de transmissão, é fatídico que diversos tipos de superfícies contaminadas que posteriormente se tornarão fômites (objeto capaz de transportar germes e patógenos), contribuem para propagação dos vírus (KRATZEL et al., 2020). A transferência de microrganismos através de fômites, apresentam cerca de 33% de eficiência, sendo os mais comuns: maçanetas, telas de celulares, caixas eletrônicos, chaves e bancadas (RIDDELL et al., 2020).

Portanto, é de grande relevância estudar as condições que favorecem a sobrevivência e remanescência do SARS-CoV-2 ao ambiente, tal como, compreender os fatores simultâneos que corroboram para isso, sendo eles: temperatura, umidade, pH, radiação solar e matriz de suspensão viral (ABOUBAKR; SHARAFELDIN; GOYAL, 2020).

Pesquisadores apontam que as variações de temperatura atuam na estabilidade do SARS-CoV-2 (KRATZEL et al., 2020), propiciando sua longa persistência ao meio, em temperaturas mais baixas (ABOUBAKR; SHARAFELDIN; GOYAL, 2020) e sua menor viabilidade em temperaturas maiores (RIDDELL et al., 2020). Kratzel et al (2020), relatou que o tempo de meia-vida do vírus em suspensão era de: 9,1 h em Temperatura Ambiente ($\sim 22^{\circ}\text{C} - 25^{\circ}\text{C}$); 12,9 h em 4°C e 17,9 h em 30°C .

Apesar disso, alguns cientistas mencionam que o aumento da temperatura ($\sim 40^{\circ}\text{C}$) em conservação da umidade, pode reduzir rigorosamente a capacidade de sobrevivência e viabilidade do vírus para 24h (RIDDELL et al., 2020). Outro estudo, também revela que a inativação do vírus em baixas temperaturas, ocorre por meio de uma degradação aleatória de seu ácido nucleico; já em altas temperaturas, acontece uma mudança conformacional das proteínas estruturais do vírus (ABOUBAKR; SHARAFELDIN; GOYAL, 2020).

Comprovadamente, o SARS-CoV-2 se mantém estável a temperatura ambiente e em uma ampla faixa de pH (3 – 10), porém quando exposto em coeficientes de pH extremo, ele se torna inativo, o qual condiz com sua alta resistência e virulência (ABOUBAKR; SHARAFELDIN; GOYAL, 2020). Por outro lado, há pesquisas que

referenciam intervenção da radiação solar UVB e UVC na diminuição da propagação do vírus, aumentando o conhecimento acerca do microrganismo (SHUMATE et al., 2020).

Em razão do patógeno ser altamente transmissível, consensualmente é admitido que os variáveis tipos de superfícies e suas características intrínsecas, impactam na capacidade contaminante, bem como, na persistência do vírus. O SARS-CoV-2 sobrevive por menos tempo em superfícies com baixa porosidade como, cobre, látex e alguns tecidos pouco porosos. Em compensação, superfícies altamente porosas como, aço inoxidável, plástico, vidro e tecidos porosos, corroboram para a conservação do mesmo (Tabela 4) (ABOUBAKR; SHARAFELDIN; GOYAL, 2020).

Tabela 4 - Resistência do SARS-CoV-2 em diferentes tipos de superfícies.

Superfície ou fômite	Temperatura (°C)	Umidade Relativa (UR)	Persistência	Tempo de decadência completa	Referência
Plástico	22	65%	4 dias	7 dias	Chin et al. (2020)
Aço Inoxidável	22	65%	4 dias	7 dias	Chin et al. (2020)
Vidro	22	65%	2 dias	4 dias	Chin et al. (2020)
Papel	22	65%	30 minutos	3 horas	Chin et al. (2020)
Madeira	22	65%	1 dia	2 dias	Chin et al. (2020)

Fonte: Elaborada pela autora com base em Aboubakr, Sharafeldin e Goyal, 2020.

1.3.4. Métodos de prevenção e assepsia

É reconhecido que os microrganismos patológicos possuem variados meios de propagação e persistência em superfícies. Em razão disso, são adotados alguns procedimentos de higienização pessoal e coletiva, para prevenir o contágio da população e reduzir a disseminação de agentes infecciosos.

Entretanto, há patógenos que apresentam um elevado grau de virulência, ocasionando doenças em numerosas pessoas como, o atual vírus SARS-CoV-2 que provoca a COVID-19. Nesse caso, as recomendações são mais rigorosas, pois além da higienização individual e geral da sociedade, outros métodos como: barreiras sanitárias, fechamento de províncias, quarentena, distanciamento social, proteção

para os olhos e uso de máscaras e respiradores faciais, garantem a mitigação do vírus em locais públicos (WANG et al., 2020).

Alguns cientistas citam que pessoas contaminadas com o novo betacoronavírus e que são assintomáticas, também se comportam como vetores, ou seja, possuem potencial transmissão a outros indivíduos via gotículas respiratórias (LIMA et al., 2020). Portanto, as diretrizes da OMS para diminuir tal contágio são: utilização de máscaras e respiradores faciais, cobrir a boca ao tossir ou espirrar, manter o distanciamento social, assepsia das mãos e superfícies e entre outras (YAN et al., 2020).

Cautelosamente outras ações também são tomadas para intervir na situação, já que locais públicos com grande circulação de pessoas como, escolas, estações ferroviárias, aeroportos etc., são consideradas áreas de espalhamento viral, e por isso devem ser desinfetados frequentemente (WANG et al., 2020). Do mesmo modo, estudiosos mencionam que condutas preventivas podem salutar a população através da conscientização, manutenção da imunidade e vitaminas, consumir dieta nutritiva e inclusão de exercícios físicos diariamente (SRIVASTAVA; SAXENA, 2020).

Constantemente sanitizantes são utilizados para esterilização de superfícies cutâneas e fômites, agindo eficientemente em poucos segundos. Os materiais de maior uso habitual, são aqueles que possuem como princípio ativo os fenóis, álcoois, sais quaternários de amônio, clorados e peróxidos. Contudo, cada substância dispõe de características químicas intrínsecas que refletem na capacidade e efetividade de sua ação (LIMA et al., 2020).

Sendo assim, desinfetantes como sabões, sabonetes e detergentes, possuem componente ativo que desestabilizam proteínas e membranas biológicas, destruindo e inativando os microrganismos (LIMA et al., 2020). Da mesma forma, materiais álcoois são capazes de desnaturar as proteínas, danificando a membrana citoplasmática dos patógenos e por isso, esses compostos simples, são hábeis para a assepsia da população (YAN et al., 2020).

Como os coronavírus são estruturados por um envelope lipídico de natureza lipofílica, sua inativação ocorre de maneira fácil e precipite dependendo do material utilizado (XILING et al., 2021). Alguns desinfetantes são indicados para diferentes tipos de superfícies, baseados em suas características físicas, químicas e biológicas. Compostos como o etanol são empregados para assepsia da pele e limpeza geral, e

isopropanol e N-propanol são usados para higienização de eletrônicos (LIMA et al., 2020).

No entanto, a determinação da eficiência de alguns desses saneantes é apoiada em efeito do tempo de ação e concentração substancial. Yan et al (2020) aponta que o álcool etílico, álcool isopropílico e N-propanol possuem melhor eficácia em concentrações de 60% e 90%. Em complemento, Xiling et al (2021) indica que uma solução de 30% de etanol é suficiente para inativar o SARS-CoV-2 em 1 minuto.

Os desinfetantes clorados alcançam uma atividade antimicrobiana em soluções, cuja concentrações e tempo para inativação, respectivamente são: 250 mg/L em 20 minutos; 500 mg/L em 5 minutos e 1000 mg/L em 0,5 minutos. Os compostos de sais quaternários de amônio são capazes de inviabilizar os coronavírus em concentrações de: 170 mg/L em 5 minutos e 850 mg/L em 0,5 minutos (XILING et al., 2021).

Todavia, grande parte desses elementos são absorvidos facilmente pelo ambiente sendo considerados ecotóxicos, bem como também são tóxicos à saúde humana. A ecotoxicidade de pequenas concentrações de cloro residual, acarretam grandes devastações agudas para animais aquáticos. Já os sais quaternários de amônio, além de serem perigos ao ecossistema, possuem caráter mutagênico e danoso às células e DNA humanos (XILING et al., 2021).

Em resposta, a utilização de materiais sustentáveis, biocompatíveis e degradáveis, pode ser uma alternativa para a assepsia de diversas superfícies, contribuindo para a preservação da saúde populacional, sem ou com baixo impacto ambiental.

A exemplo disso, substâncias fotossensíveis caracterizadas como fotossensibilizadores, podem oferecer a degradação de microrganismos patógenos, apresentando baixa citotoxicidade humana, biocompatibilidade e aumento da seletividade, por meio de mecanismos interativos da luz e do oxigênio molecular com um fotossensibilizador (KWIATKOWSKI et al., 2018).

1.4. Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (IFDA)

A inativação fotodinâmica antimicrobiana consiste na morte celular microrgânica, através da atuação concomitante de agentes fotossensibilizadores, uma matriz de radiação e a presença de oxigênio, que resultará em espécies reativas de

oxigênio citotóxicas (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). Tal técnica, oferece vantagens promissoras para inviabilização de patógenos como: protozoários, vírus, bactérias e fungos (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2007).

Embora, a utilização e estudos a cerca desse método seja considerado recente, essa prática já é conhecida desde os antigos egípcios e índios, dos quais tratavam doenças de pele como, vitiligo e leucoderma, por intermédio dos compostos orgânicos de psoralenos vegetais e luz solar (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). Contudo, sua comprovação científica se fez somente em 1900, quando o estudante Oscar Raab casualmente encontrou resultados da morte de um protozoário, após sua exposição a luz e corante de acridina (BALTAZAR et al., 2015).

Em 1904, outros pesquisadores como Herman Von Tappeiner e Albert Jodlbauer observaram a relevância da presença do oxigênio para ocorrer o efeito fototóxico, inserindo a expressão “ação fotodinâmica” para explicar o fenômeno (BALTAZAR et al., 2015). Como consequência, houve a criação de um novo campo terapêutico denominado como Terapia Fotodinâmica (TFD), no qual adota as práticas fotoindutivas nos tratamentos de enfermidades como, tumores, doenças de pele, infecções e entre outras (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

No entanto, o termo Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (IFDA) é utilizado em correspondência de tratamentos voltados para as áreas ambiental, química e materiais. Todavia, a Terapia Fotodinâmica (TFD) é aplicada nos ramos da odontologia, biomedicina e biologia, porém ambas possuem o mesmo processo de ativação fotodinâmica, tendo somente os nomes como distinção.

A técnica IFDA tem capacidade de fotodegradação de seres microbianos inseridos em algum meio, através das espécies reativas de oxigênio (ERO), das quais alteram a morfologia e funcionalidades celulares como, oxidação de proteínas, inibição de processos metabólicos e perda da atividade enzimática (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Sendo assim, esse método inovador oferece numerosas vantagens para diferentes tipos de tratamentos, incluindo para o combate ao SARS-CoV-2, já que possui alta seletividade de células-alvo, rápida eliminação microbiológica, baixo efeito colateral, ínfima invasividade (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017), grande funcionalidade requerendo pouco espaço, atua como alternativa para substituir métodos convencionais (WOZNIAK; GRINHOLC, 2018), trata infecções ou assepsia

locais específicos, não desenvolve a resistência de microrganismos (HAMBLIN, 2016) e entre outros benefícios.

1.4.1. Fotossensibilizadores (FS)

Os fotossensibilizadores (FS) são compostos químicos classificados como corantes atóxicos, capazes de absorver energia de uma matriz de luz e transferi-la para outra molécula adjacente (BALTAZAR et al., 2015), auxiliando o processo da fotoindução e/ou fotodinamismo da reação. Sendo assim, o seu uso está frequentemente vinculado à terapia fotodinâmica (TFD) e à inativação fotodinâmica antimicrobiana (IFDA).

Desde que foram descobertas as primeiras evidências científicas do efeito fotoquímico na inviabilização de microrganismos e no tratamento médico de algumas doenças, pesquisadores buscaram FS altamente eficientes e com boas propriedades físicas e químicas, dos quais facilitassem a ativação do fenômeno fotodanososo (CIEPLIK et al., 2018). Dessa forma, compostos como a acridina e a porfirina foram as primeiras substâncias fotossensíveis utilizadas no campo da TFD (BALTAZAR et al., 2015), precursando a ampliação de outras classes de corantes como: clorinas, ftalocianinas, fenotiazinas, xantenos e entre outras.

O evento fotodinâmico das reações advém da excitação energética do FS (que está em seu Estado Fundamental), através da absorção de radiação eletromagnética que ele obteve, impulsionando-o para atingir condições de curtas durações entre seus Estado Singleto Excitado ($^1\text{FS}^*$) e Estado Tripleto Excitado ($^3\text{FS}^*$), podendo formar ou não espécies reativas de oxigênio (EROS) que serão responsáveis por realizar a desinfecção local (ROSSIN et al., 2020).

As moléculas de EROS que são formadas a partir desse fenômeno fotoativo, equivalem aos superóxidos, peróxidos de hidrogênio, radicais hidroxila e/ou oxigênio singleto. Por consequência, são as responsáveis pelo desencadeamento da morte e danos microbianos, alterando a morfologia e algumas funcionalidade das células de agentes patógenos por meio de mecanismos que afetam a membrana celular, inativam enzimas e proteínas essenciais e acometem ao DNA (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Por essa razão, é de grande relevância avaliar as características e propriedades físicas e químicas dos FS, dado que suas escolhas e aplicações

apropriadas, partirão do princípio de solubilidade, baixa toxicidade, fraco ou nulo potencial mutagênico, grande estabilidade química, alta atividade fotoquímica (BALTAZAR et al., 2015), forte geração de EROS e longo tempo de vida (NYOKONG; AHSEN, 2012).

Destaca-se que cada espécie de FS possui particularidades que compartilham com o interesse de sua utilização, pois as porfirinas são de natureza hidrofílica e absorvem um comprimento de onda da faixa de 400-650 nm e as ftalocianinas são hidrofóbicas, apresentando uma absorção de luz visível entre 630-720 nm (CIEPLIK et al., 2018; BALTAZAR et al., 2015). Entretanto, a maior parte dessas substâncias fotoativas possuem a semelhança de serem fluorescentes intrinsecamente, pois apresentam moléculas aromáticas em suas estruturas (PAZ, 2006).

1.4.1.1. Interações de FS com diferentes tipos de microrganismos

É sabido que conhecer as características dos FS, refletem em suas aplicações, análises de resultados e rendimentos, contudo, as diferentes estruturas e organizações de diversos tipos de microrganismos, também influenciam na interação do corante fotoativo com os agentes patógenos, havendo a necessidade de estudos e conhecimentos baseados em suas morfogêneses (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Sendo assim, os FS majoritariamente inviabilizam os micróbios, através de sua penetração ou ligação celular, que produzirá as EROS, danificando a membrana ou a parede externa do microrganismo alvo, levando ao vazamento de todo seu conteúdo interno e sua morte sequencial (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). Portanto, cada espécie de estirpe dispõe de estruturas diferenciadas como, camadas lipídicas, polissacarídicas e lipoproteicas, que influenciam em sua robustez e permeabilidade (DONNELLY; MCCARRON; TUNNEY, 2007).

As bactérias são seres vivos unicelulares e procariontes, portadoras de uma membrana celular que reveste seu citoplasma, salvaguardando, portanto, todo seu conteúdo enzimático e metabólico. Contudo, há algumas diferenciações importantes entre as paredes celulares das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que dificulta as ligações entre os FS (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

As Gram-positivas possuem largas camadas de peptidoglicanos que circundam sua membrana citoplasmática, ao passo que as Gram-negativas portam uma

membrana externa altamente organizada que abrange uma outra membrana interna de peptidoglicanos, do qual contêm a membrana citoplasmática. Para ocorrência da inativação fotodinâmica, é necessário que o corante fotoativo se associe ou penetre à parede celular bacteriana até alcançar a membrana citoplasmática, e por isso, as Gram-positivas são mais suscetíveis ao IFDA (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017; DURANTI, 2006).

Desse modo, pesquisadores apontam que a membrana externa das Gram-negativas dispõe de locais carregados negativamente e por esse motivo, os FS catiônicos, fotoestáveis e solúveis em água, são as substâncias mais vantajosas e indicadas para sua inativação. (DURANTI, 2006; MAISCH, 2015).

Os fungos são organismos eucariontes que podem conter variações em seus envoltórios, mas que predominantemente detêm uma membrana externa porosa composta por polissacarídeos como: glucana, manana e quitina, que são substâncias mais permeáveis em comparação com as bactérias Gram-negativas. (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Os mecanismos de ação da IFDA para combater essas espécies, se deve principalmente pela geração de EROS, que são capazes de alterar a estrutura da parede celular fúngica, facilitando a entrada dos FS ao interior da célula. Os corantes fotoativos causam desequilíbrio na homeostase celular, danificando organelas citoplasmáticas e ácidos nucleicos e por fim, provocando a morte por apoptose (BALTAZAR et al., 2015).

O emprego da IFDA para o combate de fungos, pode ser mais dificultoso em relação ao tamanho de sua célula em conferência de outras, exigindo uma maior quantidade de FS locais para geração de EROS (DONNELLY; MCCCARRON; TUNNEY, 2007; KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). No entanto, esse tipo de prática também apresenta resultados promissores, já que alguns estudos detalham que não há efeitos mutagênicos ou genotóxicos nas células fúngicas e humanas (BALTAZAR et al., 2015).

Em síntese, os vírus que são microrganismos acelulares e que possuem um envelope viral constituído por lipídios e proteínas, são afetados através das conexões dos FS com seus sítios de ligação, danificando as proteínas do invólucro e consequentemente inativando o agente (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). À vista disso, a IFDA acomete essa classe de patógenos de forma irreversível, afetando

potencialmente toda sua estrutura, tendo como efeito a influência decrescente sobre os fatores de virulência (ALMEIDA; FAUSTINO; NEVES, 2020).

1.4.2. Oxigênio Singleto

O oxigênio singleto é uma espécie derivativa do oxigênio molecular, que apresenta alta reatividade e grande excitação eletrônica, mas com tempo de meia vida muito curto e instável. Contudo, suas características peculiares e resultados promitentes, atraem estudos e aplicações de diversas áreas da ciência como a fotoquímica, fotobiologia e fotofísica (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002).

Esse tipo EROS é produzido através da capacidade absorptiva que um FS possui, ao captar radiação visível ou UV, podendo transferir energia ou elétrons para moléculas adjacentes, sendo caracterizado como um processo físico e químico (KRIEGER-LISZKAY, 2005). No entanto, sua geração também se dá por outros métodos, como os biológicos e químicos por meio das reações enzimáticas e não enzimáticas, bem como as termodecomposições de dioxietanos e endoperóxidos (DAVIES, 2003; RONSEIN et al., 2006).

A condição fundamental do oxigênio molecular, consiste em seu estado tripleto, do qual dispõe de dois elétrons desemparelhados com o mesmo número quântico de spin, ocupando distintos orbitais anti-ligação de mesma energia. Contudo, através de uma ampliação energética, a regra de conservação do spin é retirada e produzida o oxigênio singleto, uma espécie molecular mais oxidativa (KRIEGER-LISZKAY, 2005; RONSEIN et al., 2006).

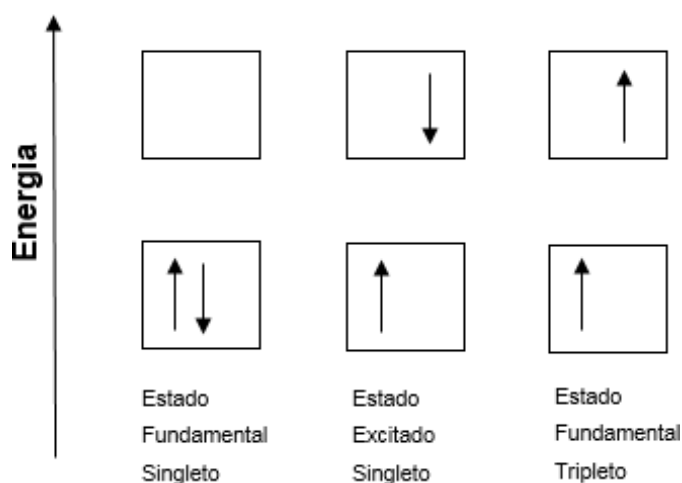
Apesar de exibir alta característica oxidante e reatividade termodinâmica, o oxigênio singleto possui reações cineticamente lentas, em consequência da restrição do spin (KRIEGER-LISZKAY, 2005). Dado isso, torna-se relevante os estudos que sustentem informações para otimizar esse processo e prolongar a vida útil do espécime, já que o mesmo pode ser utilizado em diversos campos da saúde, materiais, biológicas e químicas.

O emprego dessa espécie reativa de oxigênio, está sendo constantemente avaliado e aplicado, principalmente na desinfecção de águas residuais, síntese de química fina, terapia fotodinâmica e na inativação fotodinâmica antimicrobiana (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002). Isso ocorre, por causa da potente força oxidativa do oxigênio singleto perante as biomoléculas microbianas, resultando em sua inativação.

Em vista disso, pesquisas indicam que esses estados excitados do oxigênio molecular, são capazes de reagir com aminoácidos, proteínas e lipídios de agentes patógenos (KNOX; DODGE, 1985) e possivelmente alterar as cadeias laterais e estruturais dessas moléculas biológicas (DAVIES, 2003). Sendo assim, as proteínas tornam-se os principais alvos oxidativos da TFD e IFDA, pois constituem aproximadamente 68% do peso seco das células e tecidos, corroborando para obter bons efeitos. (DAVIES, 2003).

Portanto, alguns estudos referenciam que o oxigênio singlete é um excelente agente antisséptico, pois suprime microrganismos patógenos como bactérias, protozoários, fungos e vírus. Além disso, existem trabalhos que elencam dados sobre a inviabilização dos vírus herpes simplex do tipo 1 (*HSV-1*) e herpes suído do tipo 1 (*SHV-1*) (MÜLLER-BREITKREUTZ et al., 1995), bem como a inativação de um bacteriófago após modificações químicas na proteína do capsídeo (RULE WIGGINTON et al., 2010).

Figura 3 - Estados de energia e orbitais do oxigênio



Fonte: Própria autoria, 2022.

1.4.3. Matriz de radiação

As fontes de radiação eletromagnética, atuam como um dos principais fatores coadjuvantes na TDF e IFDA, pois oferecem a energia necessária para excitação do FS, acarretando a produção de EROS. Portanto, é de suma importância conhecer a natureza química e física dos corantes fotoativos, sua faixa de absorção do espectro e os tipos de matrizes fotovoltaicas que irão participar do processo.

Para obtenção de bons resultados e eficiência dessas técnicas, torna-se relevante o reconhecimento da absorção do comprimento de onda específico de cada FS utilizado, já que ele é estimulado de acordo com suas características moleculares predominantes, sendo assim, o ajuste da fonte de luz oferece a otimização da máxima absorção possível realizada pelo FS, gerando altas quantidades de EROS e prolongando a meia-vida desses elementos (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Do mesmo modo, é necessário a identificação dos tipos, locais e períodos de aplicações da radiação eletromagnética, visto que, podem oferecer danos ou benefícios para as áreas atribuídas (SAMPAIO, 2019). Comprimentos de ondas mais longos são preferencialmente utilizados em práticas *in vivo*, pois exibem maior penetração nos tecidos, absorvendo e espalhando a luz visível incidente (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Com relação as matrizes de radiação, sua escolha, emprego e finalidade dependerão da expectativa e necessidade do indivíduo, dado que, para a TDF e/ou IFDA a melhor fonte de luz é aquela que fornece alta emissão, sem efeitos térmicos significativos, de baixo custo e fácil acessibilidade (HASEGAWA, 2012). Atualmente, são utilizados diversos modelos de instrumentos radiônicos como, lâmpadas LEDs, lasers, lâmpadas halógenas, luz negra e lâmpadas de vapor de mercúrio e sódio.

Os diodos emissores de luz (LEDs) e lasers, são amplamente empregados na TDF e IFDA (SAMPAIO, 2019) cada um oferecendo efeitos notáveis. À vista disso, o LED é uma matriz de radiação favorável para este presente estudo, pois suas propriedades são: emissão de luz em uma extensa faixa do espectro com comprimento de onda predominante, são policromáticos de propagação não coerente e não colimada, sendo de baixo custo, compactos e leves (HASEGAWA, 2012; SAMPAIO, 2019).

1.4.4. Processos da IFDA e mecanismos de reação

Notoriamente, a inativação fotodinâmica antimicrobiana é uma técnica utilizada em diversos meios, para inutilização de agentes patológicos, através do emprego de FS, fonte de luz em comprimento de onda adequado e presença de oxigênio molecular (ROSSIN et al., 2020). Tal prática, contempla a aplicação de insumos atóxicos, biodegradáveis, fontes renováveis de baixo impacto ambiental e com excelentíssimos resultados em seus destinos.

À vista disso, torna-se imprescindível reconhecer a nível microscópico, os mecanismos de ação desse processo fotodinâmico, a fim de compreender as importantes propriedades dos corantes fotoativos, produtos de reação (EROS), estados de excitação molecular e comprimentos de onda absorvidos e emitidos, através de todo conjunto explicativo deste estudo nos tópicos anteriores.

O método da IFDA pode ser elucidado por intermédio do Diagrama de Jablonski (ilustrado na figura 4), do qual reúne objetivamente todas as etapas desse sistema. Um FS em seu estado fundamental (S_0) possui maior estabilidade atômica e eletrônica, porém quando irradiado por uma matriz de luz, absorve energia e passa para uma condição de curta duração, denominado como estado excitado singleto (S_1), podendo atingir maiores estado de energia como S_2 e S_n (RONSEIN et al., 2006; KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

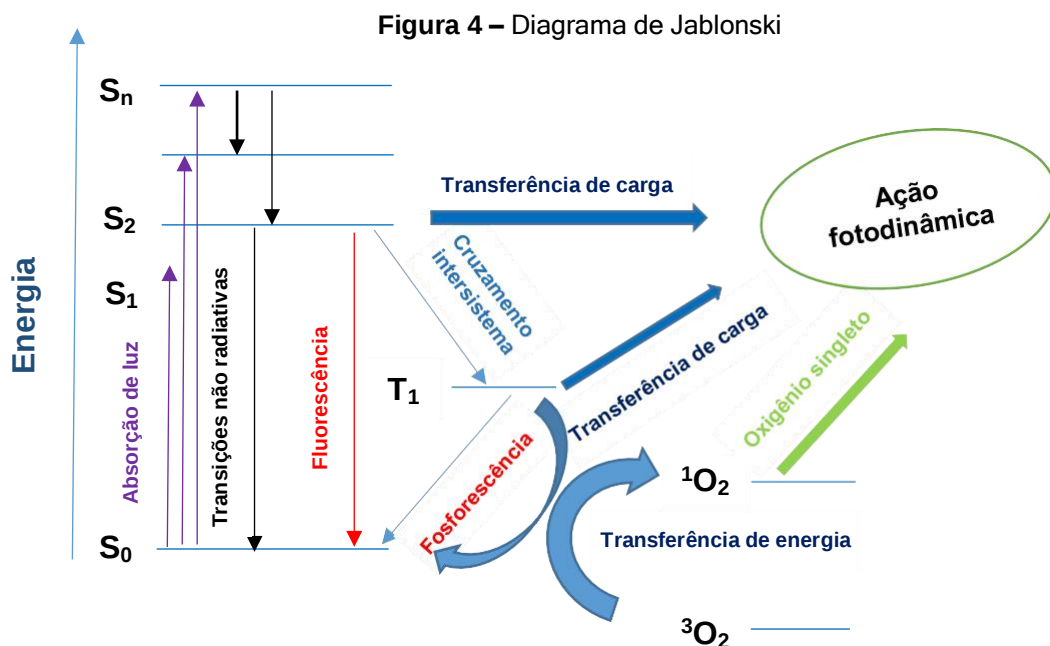
No entanto, a forte tendência do retorno do FS estimulado (S_1) para seu estado fundamental (S_0), pode promover três situações distintas como: a) emissão de luz (fluorescência), b) difusão de calor (conhecida como conversão interna) ou c) inversão espontânea do spin do elétron excitado, gerando o estado excitado tripleto (T_1) nomeado como cruzamento intersistema. Em circunstância da formação do T_1 , há a possibilidade de a espécie regressar para seu estado de menor energia (S_0) emitindo luz fosforescente ou reagir fotoquimicamente (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

A partir da disposição do FS em seu estado excitado tripleto (T_1), ocorre a interação deste, com moléculas dispersas ao meio, acarretando na criação de EROS. Para tal fim, processa-se dois tipos de sistemas distintos, designados como mecanismo do tipo I e II (ROSSIN et al., 2020).

No mecanismo do tipo I, sucede uma transferência de elétrons para o corante fotossensibilizante, e por meio da correlação entre este e da presença de oxigênio, forma-se radicais como hidroxilas, superóxidos e peróxidos de hidrogênio. Já no mecanismo do tipo II, acontece uma transferência de energia do FS para o oxigênio molecular 3O_2 , produzindo uma espécie altamente reativa de oxigênio excitado singleto 1O_2 , sendo este o elemento fundamental para a inativação de patógenos. (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Ambos sistemas de reação, oferecem ótimos resultados para o combate de biomoléculas de microrganismos alvos, apesar deste presente projeto possuir ênfase no oxigênio singleto, é importante salientar que para obter otimização desses

processos, deve-se averiguar minuciosamente cada utensílio, insumo e análises participativas da metodologia, visto que um dos principais desafios da TDF ou IFDA, é o melhoramento do tempo de vida das EROS, irradiar um comprimento de onda apropriado e a diminuição do fotobranqueamento (RONCHI et al., 2007).



Fonte: Adaptado de PRATAVIEIRA, 2020.

1.5. Nanociência e Nanotecnologia

Em reflexo de uma constante transformação planetária e no rápido desenvolvimento humano, torna-se necessário a inovação tecnológica e o crescimento da ciência que acompanha esse cenário. Diante disso, a busca pelo conhecimento expansivo sobre a miniaturização de ferramentas e sistemas que possuam um excelente desempenho, alcançou novos patamares e acarretou na criação de um novo estudo: a nanociência.

Em 1959, o físico norte-americano Richard Feynman instigou o público de uma conferência, ao propor a possibilidade da manipulação de átomos e moléculas em suas dimensões e/ou superfícies, a fim de otimizá-las e desenvolver novos materiais em tamanhos reduzidos. Sendo assim, Feynman foi um dos pioneiros responsáveis pela ideia de uma nova erudição baseada em princípios quânticos, sendo mais tarde, cunhada como “nanotecnologia” pelo pesquisador Norio Taniguchi (TOMA; ARAKI, 2005; ALVES, 2004).

Resumidamente, a **nanociência** é uma área de concentração que estuda conceitos fundamentais, teóricos, estruturais e das propriedades de moléculas e átomos, sendo que ao menos uma das proporções trabalhadas, consiste em nanômetros ($1\text{ nm} = 10^{-9}\text{ m}$) (ALVES, 2004; HORNYAK et al., 2008). Todavia, a **nanotecnologia** é o campo que caracteriza, desenvolve, manipula e aplica nanoestruturas em dispositivos nanoutilizáveis e esta correlacionada com as necessidades da nanociência (DELGADO, 2013; HORNYAK et al., 2008).

A nanotecnologia, é um domínio científico de qualidade multidisciplinar, englobando diferentes expertises em engenharias, química, física, biologia, mecânica, entre outras, para explicar os fenômenos ocorridos. No entanto, assim como em outros âmbitos científicos, ela também apresenta subáreas destinadas à compreensão de especificidades como, nanobiotecnologia, nanomateriais, nanofotônica, nanoenergia, nanoambiente, nanoeletrônica etc. (DELGADO, 2013).

Dessa maneira, para efetuar uma boa inteligência desses estudos, é essencial a agregação de significativos conhecimentos sobre a química e física do estado sólido, métodos e propriedades de medidas, bandas de energia, propriedades de nanopartículas individuais, materiais nanoestruturados, domínio de equipamentos microscópicos e espectroscópicos e entre outros (ALVES, 2004).

Visto que, o entendimento das relações físicas e químicas de moléculas, possibilita a síntese de novos materiais com estruturas, propriedades e comportamentos específicos, o desenvolvimento de nanoestruturas em setores químico, farmacêutico, eletrônico, automotivo, energia, remediação ambiental, entre outros, vem se tornando uma potente fonte de investimentos em diversos países, contribuindo para o progresso econômico, competitividade em escala industrial e avanços científicos (MARCONE, 2015; ALVES, 2004).

1.5.1. Sistemas nanocarreadores

Nanotransportadores são partículas de dimensões nanométricas, cuja principal função é atuar no carregamento, biodisponibilidade e proteção de princípios ativos até alvos específicos. Apresentam características e estruturas intrínsecas, baseadas em sua composição, disposição e estruturação, promovendo resultados regozijantes de acordo com suas aplicações e finalidades.

Alguns desses compostos podem apresentar natureza lipofílica, hidrofílica, hidrofóbica ou anfifílica que influenciam na atividade de moléculas ativas (FS ou fármaco), bem como em sua solubilidade, concentração e tempo de meia-vida (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). Portanto, nanocarreadores (NC) são capazes de auxiliar na preservação de uma possível biodegradação dessas substâncias, aumentar sua biodisponibilidade, promover liberação sustentada, reduzir a toxicidade etc. (MARTINS, 2019).

O crescente estudo das aplicabilidades de NC no campo da biomedicina, farmacêutica e medicina, proporcionam excelentes avanços em tratamentos tumorais, dermatológicos, *drug-delivery*, entre outros, já que os carreadores podem ultrapassar barreiras biológicas em direção de células alvos agilizando a eficiência da intervenção médica (VIEIRA; GAMARRA, 2016; DELGADO, 2013).

Os sistemas nanocarreadores dispostos atualmente apresentam características particulares e específicas, sendo: micelas, lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas, nanopartículas magnéticas, dendrímeros e nanopartículas poliméricas (Nanoesferas e Nanocápsulas). No entanto, estudos apontam que as melhores nanoestruturas destinadas à entrega de FS são os lipossomas, micelas e nanopartículas poliméricas (KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017).

Micelas

As micelas são partículas de configuração globular e de natureza anfipáticas (que possui uma estrutura hidrofílica e outra hidrofóbica), que são geradas espontaneamente a partir de sua dispersão em solução aquosa, produzindo uma grande associação molecular de diâmetros coloidais (MANIASSO, 2001).

Atualmente, os sistemas micelares estão dispostos em três categorias: micelas mistas, nanopartículas micelares e micelas poliméricas, sendo a última muito utilizada para transportar fármacos, visto que, elas possuem dimensões de 10 a 200 nm e são capazes de se automontar em blocos de copolímeros hidrofílicos e hidrofóbicos retraindo em seu núcleo um princípio ativo lipossolúvel encapsulado (DIMER et al., 2013).

Lipossomas

São estruturas vesiculares auto-organizada com formato de concha esférica, constituída por uma bicamada de lipídios anfipáticos como os fosfolipídios naturais e colesterol (MARCONE, 2015; KASHEF; HUANG; HAMBLIN, 2017). Possuem um tamanho de aproximadamente 80-300 nm e vantagens como alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, baixa citotoxicidade, não-imunogênico, fácil encapsulação de princípios ativos, etc. (DIMER et al., 2013; DELGADO, 2013).

Nanopartículas lipídicas sólidas

As nanopartículas lipídicas sólidas, foram originalmente desenvolvidas em 1991, como um método alternativo de encapsulação de princípios ativos em equivalência aos meios tradicionais (SOUTO et al., 2011). São partículas coloidais compostas por lipídio sólido, surfactante e água, originando uma mistura complexa de núcleo denso com um tamanho estimado entre 80-300 nm (MARCONE, 2015).

O emprego dos componentes para a fabricação desses nanocarreadores, podem ser lipídios como: triglicerídeos, ácidos graxos, fosfolipídios e ceras; já os surfactantes compreendem: poloxameros, polisorbato, polietilenoglicol, lecitina e ácidos biliares (COUTINHO, 2015). Sendo assim, apresentam ótimas vantagens como biocompatibilidade, baixa citotoxicidade, grande estabilidade físico-química e elevada capacidade de encapsular compostos hidrofílicos e lipofílicos em sua matriz (DIMER et al., 2013; SOUTO et al., 2011).

Dendrímeros

Dendrímeros são uma classe de polímeros sintéticos macromoleculares, ramificados e monodispersos que apresentam uma aparência semiesférica e de tamanhos entre 2-10 nm. Podem conter em sua estrutura, substâncias como lipídios, polissacarídeos, peptídeos, entre outros, e são amplamente empregados em áreas medicinais, pois apresentam forte biocompatibilidade e biodegradabilidade (MENACHO, 2012).

Sua propriedade terapêutica também se deve pelos seus grupos químicos terminais retidos na superfície como, hidroxila, carboxila, aminas, etc., evidenciando uma série de funções benéficas para alguns tratamentos (MENACHO, 2012).

Nanopartículas poliméricas

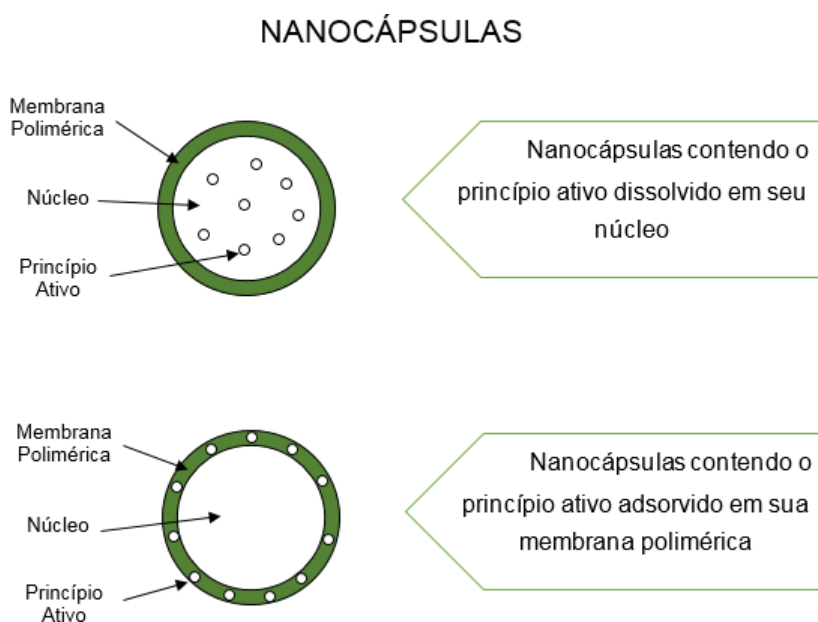
Nanopartículas poliméricas (NPs) são compostos coloidais (solução que contém dispersamente partículas nanométricas) constituídos majoritariamente por

polímeros naturais, sintéticos ou semissintéticos, podendo conter ou não em sua estrutura, a presença de óleos e água (DELGADO, 2013). São nanocarreadores difusamente utilizados em áreas farmacêutica e médica, já que possuem um excelente desempenho em armazenamento e liberação de fármacos (SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005).

Esse tipo de sistema transportador pode ser dividido em duas espécies de arranjos diferenciados, denominados como nanocápsulas e nanoesferas, que serão obtidas a partir da metodologia empregada para seu desenvolvimento e o destino requisitado (DE OLIVEIRA, 2014).

Sendo assim, as **nanocápsulas** são definidas como um elemento reservatório com tamanho estimado entre 10 a 1000 nm e que dispõem de um núcleo líquido (óleo ou água) envolvido por um invólucro de polímero, incluindo de um princípio ativo que pode estar dissolvido em sua matriz ou adsorvido em sua parede polimérica, como mostra na **figura 5** (SCHMALTZ; SANTOS; GUTERRES, 2005; DELGADO, 2013).

Figura 5 - Elucidação de nanocápsulas



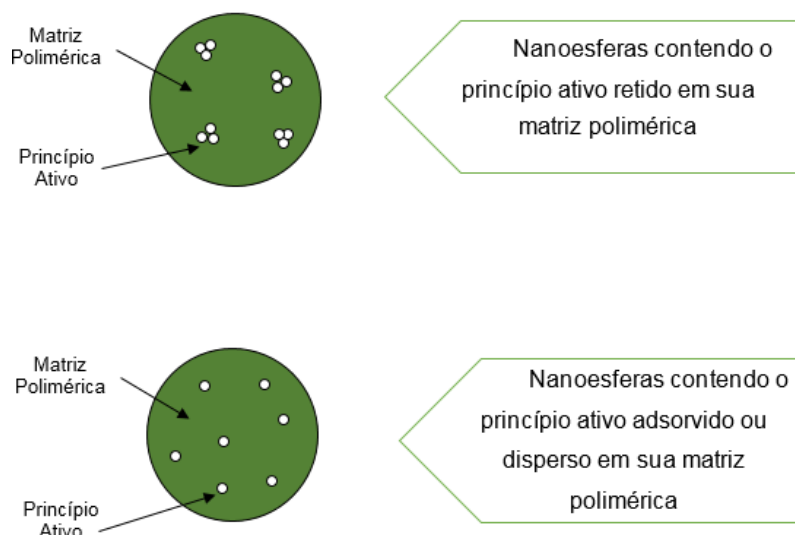
Fonte: Elaborada pela autora com base em Delgado, 2013.

No entanto, as **nanoesferas** são determinadas como unidades matriciais poliméricas que não possuem núcleo distinto, ou seja, o princípio ativo pode estar adsorvido em sua superfície ou disperso homogeneamente na matriz polimérica, como ilustrado na figura 6 (DE OLIVEIRA, 2014; DELGADO, 2013). Não obstante, as

propriedades de todos os compostos participantes das NPs (princípio ativo e polímero), influenciam diretamente na liberação da substância para o meio, biodegradabilidade, toxicidade, biocompatibilidade, etc. (DELGADO, 2013).

Figura 6 - Ilustração de nanoesferas

NANOESEFERAS



Fonte: Elaborada pela autora com base em Delgado, 2013.

1.5.2. Polímeros Biodegradáveis

Polímeros biodegradáveis são compostos químicos de caráter natural ou sintético, que se degradam em complexos mais simples por vias metabólicas de microrganismos como, bactérias, fungos e algas (RAMOS, 2018; SERWAŃSKA-LEJA; LEWANDOWICZ, 2010). Portanto, recebem grande demanda para o desenvolvimento de novos materiais, visto que suas vantagens vão desde a redução do impacto ambiental à otimização das propriedades de sistemas.

No entanto, o crescente progresso da nanotecnologia nas áreas farmacêuticas, bioquímicas e agroquímicas, fortalecem o empenho de novas descobertas para a manipulação e síntese de nanocarreadores que possuam excelente funcionalidade e aplicabilidade em diversos meios. À vista disso, a utilização de polímeros biodegradáveis na composição de nanopartículas transportadoras, podem oferecer numerosas melhorias para esses materiais.

A integração de polímeros em redes nanoparticuladas, auxilia na elaboração de nanopartículas poliméricas como, nanoesferas e nanocápsulas, promovendo uma

maior ductilidade, processabilidade e flexibilidade, que são provenientes da natureza do polímero (KONG, 2016). Sendo assim, tais compósitos obtêm boa estabilidade térmica, baixa toxicidade, alta compatibilidade e biodegradabilidade, fácil manipulação e excreção do organismo vivo (DE OLIVEIRA, 2014).

Os polímeros biodegradáveis de maior uso habitual na preparação de nanopartículas poliméricas, pertencem à família dos poliésteres, como o poli (ϵ -caprolactona) (PCL), poli (ácido lático) (PLA), poli (ácido lático-co-glicólico) (PLGA), poli (metil-metacrilato) (PMMA) e polibutileno succinato-co-butileno dilinoleato (PBS: PBSL) (DE OLIVEIRA, 2014). Contudo, outras substâncias poliméricas também podem ser utilizadas, como os biopolímeros: albumina, celulose, quitosana, zeína, alginatos, etc. (DELGADO, 2013).

Consequentemente, se faz necessário compreender os tipos de processos de biodegradação e os seus elementos participantes, já que os produtos dessas reações de decomposição, poderão apresentar atividades desfavoráveis ao sistema (RAMOS, 2018). A **biodegradação aeróbica** (presença de O_2) produzirá dióxido de carbono, já a **biodegradação anaeróbica** (ausência de O_2) resultará em metano (SERWAŃSKA-LEJA; LEWANDOWICZ, 2010).

Em síntese, as espécies de materiais envolvidas no meio degradacional também influem na funcionalidade das nanopartículas poliméricas, pois alguns compostos biodegradáveis sofrem fragmentação *in vivo* e não são eliminados pelo organismo; já compostos biorreabsorvíveis geram produtos que são excretados. Portanto, fatores como a estrutura química, física e físico-mecânica dessas substâncias, interferem potencialmente na biodegradação (RAMOS, 2018; SERWAŃSKA-LEJA; LEWANDOWICZ, 2010).

1.5.3. Métodos de nanoencapsulação

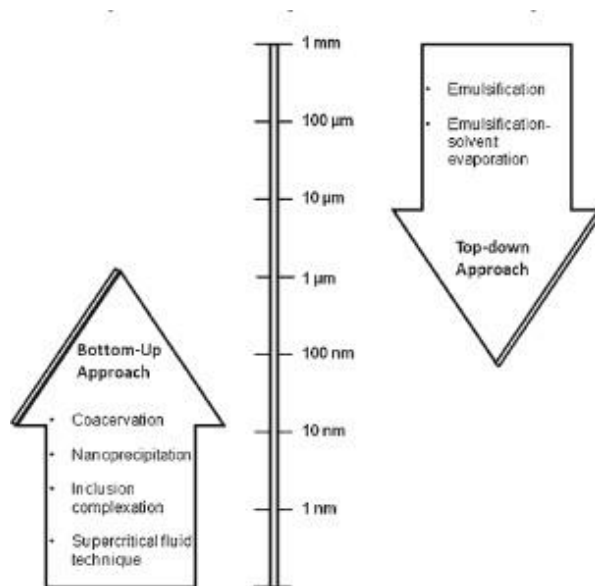
A escolha da metodologia para o preparo das nanopartículas, corresponde a uma etapa de grande importância para o processo, considerando que através dessa seleção, haverá a possibilidade de presumir as características necessárias para a constituição das nanoestruturas, como tamanho, superfície, aspectos físico-químicos, entre outros (REIS et al., 2006). Portanto, conhecer os tipos de técnicas disponíveis e a natureza dos materiais envolvidos, auxilia no desenvolvimento e aprimoramento desses compostos.

A formulação das nanopartículas abrange prévios parâmetros significativos que antevê a definição dos mecanismos de preparação, pois torna-se oportuno identificar as propriedades físico-químicas de todas as substâncias participantes como, os polímeros e os princípios ativos, já que a hidrofobicidade, carga superficial, peso molecular e entre outros atributos desses elementos, podem interferir na formação dos nanosistemas (HOLKEM et al., 2015; REIS et al., 2006).

De antemão, é essencial entender que a produção das nanopartículas, são categorizadas em: **polimerização *in situ* de monômeros dispersos**, que dispõe de técnicas como, polimerização em emulsão, polimerização interfacial e policondensação interfacial; ou na **precipitação de polímeros pré-formados**, que emprega estratégias como, emulsificação/evaporação de solvente, deslocamento de solvente e deposição interfacial, emulsificação/difusão de solvente e *salting-out* (SCHAFFAZICK et al., 2003; REIS et al, 2006).

Alguns procedimentos são utilizados para a criação de novos materiais nanoescalares, como também agrupam métodos para confecção desses (vide a figura 7). No processo “*botton-up*” (de baixo para cima), os compósitos são elaborados por moléculas auto montáveis e auto-organizáveis, das quais sofrem influência do pH, temperatura, força iônica e concentração. Já no sistema “*top-down*” (de cima para baixo), há uma aplicação de instrumentos precisos para a constituição de estruturas, propiciando suas modificações de tamanho e modelagem (EZHILARASI et al., 2013; HOLKEM et al., 2015).

Figura 7 - Sistematização dos tipos de metodologias para produção de nanocompósitos



Fonte: EZHILARASI et al., 2013.

Diante disso, o autor Ezhilarasi et al (2013), relata em sua revisão que para selecionar uma boa técnica de nanoencapsulação, é adequado basear-se no tamanho necessário da partícula, nas propriedades físico-químicas, natureza do núcleo do composto e na composição da parede do material. Portanto, torna-se imprescindível fazer um planejamento eficiente e adquirir informações substanciais sobre a metodologia, já que as estratégias de encapsulação são complexas, pois há uma certa dificuldade em obter uma morfologia ideal da cápsula e do núcleo do material (EZHILARASI et al., 2013).

Outro aspecto muito importante a ser ponderado, concerne à caracterização completa das nanopartículas, do qual analisa características qualitativas e quantitativas primordiais como, estado de agregação, sorção, dispersão, tamanho, estrutura e formato etc., que podem ser avaliadas com diferentes tipos de equipamentos tal como, Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Microscópio Eletrônico de Transmissão (MET), Cromatógrafo gasoso e/ou líquido, entre outros (EZHILARASI et al., 2013).

2. OBJETIVOS

Desenvolver desinfetantes de superfícies com longa duração para controlar o SARS- CoV-2 e outros microrganismos patógenos, considerando que esse sistema contenha polímeros biodegradáveis e moléculas fotoativas que promovam a ativação do oxigênio molecular a partir da luz visível. Portanto, utilizando o mecanismo da Inativação Fotodinâmica Antimicrobiana (IFDA) para inativar a ação microbiana e promover a desinfecção local.

2.1. Objetivos Específicos

- Desenvolver e caracterizar diferentes tipos de partículas submicrométricas por meio de polímeros/monômeros combinados a compostos fotossensíveis, utilizando técnicas de fluxo contínuo para salvaguardar a produção em escala;
- Preparar dois tipos de sistemas nanocarreadores, nanocápsulas poliméricas e nanoemulsões;
- Identificar, sintetizar e caracterizar as nanopartículas contendo moléculas fotoativas;
- Avaliar a estabilidade e durabilidade das nanopartículas por meio de técnicas de espalhamento de luz dinâmica e morfologia das estruturas;
- Testar a capacidade de produção de oxigênio singleto dos materiais submicrométricos.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes e instrumentos

Os reagentes e compostos utilizados foram: Span 60®, Tween® 80, Myritol®, poli-ε-caprolactona granulada (PCL), Acetona P.A (Dinâmica®), Dimetilsulfóxido (DMSO) P.A (Synth®), Água Milli-Q (Direct-Q® 3), Azul de Metileno em pó e por último, o fotossensibilizador denominado como Diphenyl BTZ¹⁻⁶ (4,7-diphenylbenzo[c][1,2,5]thiadiazole), sintetizado pelos pesquisadores S. Patterson, D. Taylor & C. Thomson em parceria com a *Heriot-Watt University- Edinburgh*.

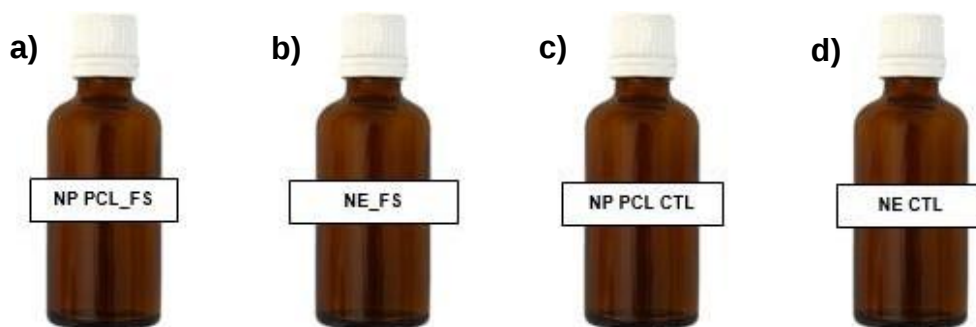
Com relação aos equipamentos, foram utilizadas 4 fontes de luz UV LED 3W a 400-410 nm, conectadas a um dissipador de calor e adaptados ao interior de uma câmara de luz UV estruturada em madeira; Agitador magnético (Marte®), Rotaevaporador (IKA®), Ultrassônico (Unique®), Dynamic Light Scattering (DLS) do modelo Zetasizer Nano ZS90 - Malvern®, Espectrofotômetro UV-Vis do modelo Cary50 - Varian® e Microscópio de Força Atômica (MFA) do modelo EasyScan2 - NanoSurf®.

3.2. Metodologia

3.2.1. Preparação das formulações nanoestruturadas

As nanocápsulas poliméricas foram desenvolvidas através do método de nanoprecipitação, enquanto as nanoemulsões foram preparadas por intermédio da técnica de emulsificação espontânea, ambas em duplicata, obtendo uma formulação controle e outra contendo o fotoativo encapsulado, ambas com volume final de 10 mL e armazenadas em frasco de vidro âmbar em temperatura ambiente (20-25 °C).

Figura 8 - Formulações de nanopartículas e nanoemulsões confeccionadas, considerando a) NP PCL_FS, b) NE_FS, c) NP PCL CTL e d) NE CTL.



Fonte: Própria autoria

3.2.2. Nanopartículas poliméricas

Para o preparo da fase orgânica foram dissolvidos a PCL granulada (100 mg) e Span 60® (40 mg) em 30 mL de acetona, sob banho-maria (40 °C) em agitação magnética de velocidade mediana, provida de uma barra magnética como auxiliador, por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 240 µL de Myritol®. Já para a fase aquosa, foi dissolvido 60 mg de Tween 80® em 30 mL de água destilada, sob agitação magnética de velocidade mediana, provida de uma barra magnética como auxiliador, à temperatura ambiente, por cerca de 10 minutos.

Após o resfriamento das soluções à temperatura ambiente, cuidadosamente foi vertido a fase orgânica na fase aquosa com o auxílio de uma ponteira de 10 mL, demonstrando a formação de uma suspensão coloidal esbranquiçada. Por fim, a solução obtida foi inserida no rotaevaporador com o intuito de volatilizar toda a acetona remanescente.

O preparo das nanopartículas poliméricas contendo o FS foram preparadas seguindo o mesmo procedimento acima descrito, apenas com a adição de 10 mg de FS na fase orgânica.

3.2.3. Nanoemulsões

Para o preparo da fase orgânica, foi dissolvido o Span 60® (120 mg) em 25 mL de acetona, sob agitação magnética de velocidade mediana, provida de uma barra magnética como auxiliador, à temperatura ambiente, por cerca de 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 240 µL de Myritol®. Já para a fase aquosa, foi dissolvido 120 mg de Tween 80® em 50 mL de água destilada, sob agitação magnética de velocidade mediana, provida de uma barra magnética como auxiliador, à temperatura ambiente, por cerca de 10 minutos.

Após o resfriamento das soluções à temperatura ambiente, cuidadosamente foi vertido a fase orgânica na fase aquosa com o auxílio de uma ponteira de 10 mL, demonstrando a formação de uma suspensão coloidal esbranquiçada. Por fim, a solução obtida foi inserida no rotaevaporador com o intuito de volatilizar toda a acetona remanescente.

O preparo das nanoemulsões contendo o FS foram preparadas seguindo o mesmo procedimento acima descrito, apenas com a adição de 10 mg de FS na fase orgânica.

3.2.4. Curva de absorção e calibração do FS Diph-BTZ

Com o intuito de averiguar o melhor comprimento de onda absorvido pelo FS Diph-BTZ, em função do espectro eletromagnético do UV-Visível compreendido de 200 a 800 nm, foi realizado uma varredura, no qual resultou em um pico de absorbância de 380 nm.

Em sequência, foi elaborado uma curva de calibração em função de concentrações conhecidas e suas respectivas absorbâncias, correspondendo a Lei de Lambert-Beer, do qual determina que a energia absorvida por uma amostra está diretamente relacionada à quantidade de espécies absorventes presentes nela (GOMES et al., 2008). Sendo assim, foi produzido uma solução estoque de FS Diph-BTZ com a concentração de 100 µg/mL em um balão volumétrico de 10 mL, tendo como solvente o DMSO e homogeneizado em ultrassônico.

Após o cálculo de diluição ser feito, foi estimado que as soluções seriam executadas em balões volumétricos de 5 mL, com concentrações de 5 µg/mL, 10 µg/mL, 15 µg/mL, 20 µg/mL e 25 µg/mL, utilizando como solvente e como branco, o reagente DMSO, realizando sucessivamente as leituras no espectrofotômetro do UV-Vis.

3.2.5. Avaliação da estabilidade das nanoestruturas por *Dynamic Light Scattering* (DLS)

De forma categórica, avaliar a estabilidade das suspensões nanoestruturais após sua síntese, torna-se um fator de elevada importância, já que parâmetros como distribuição de tamanho, polidispersividade e o potencial zeta, fornecem informações detalhadas sobre a qualidade das partículas, energia cinética, coeficiente de difusão, eficiência metodológica escolhida e sua efetividade para as aplicações destinadas (LIM et al., 2013).

À vista disso, o método de espectroscopia de correlação de fótons ou também conhecido como espalhamento dinâmico de luz (*Dynamic Light Scattering*) (HOO et al., 2008), vem sendo amplamente empregado em análises físico-químicas das nanopartículas, dado que, sua leitura fortemente precisa e sensível permite calcular o movimento aleatório browniano das partículas e seu consequente tamanho hidrodinâmico (LIM et al., 2013), bem como sua homogeneidade dispersiva e

características eletrostáticas das superfícies das partículas (SCHAFFAZICK et al., 2003a).

Portanto, para quantificar a caracterização das formulações sintetizadas, examinando o seu Índice de Polidispersividade (PDI) e Diâmetro Médio, foi adicionado alíquotas de 1 mL (diluídas 100x) de cada amostra em uma cubeta de poliestireno quadrada de 12 mm, sendo apuradas em triplicata no equipamento a 25° C. Posteriormente, o Potencial Zeta (PZ) foi avaliado no mesmo instrumento e em triplicata, utilizando as mesmas alíquotas das leituras anteriores em uma célula capilar.

3.2.6. Avaliação morfológica das nanoestruturas por *Atomic Force Microscopy* (AFM)

A técnica de microscopia de força atômica (*Atomic Force Microscopy*), consiste em caracterizar moléculas à nível atômico, sendo capaz de exibir dados qualitativos e quantitativos das partículas, como tamanho, morfologia, rugosidade e textura superficial, mede forças intermoleculares e intramoleculares, forças capilares, forças eletrostáticas e magnéticas, além de formar imagens aprimoradas do analito (BAJAJ; JOSHI, 2021; FARRE; BARCELÓ, 2012).

Por se tratar de um método acessível e vantajoso, o AFM ganhou diversas aplicabilidades nas análises científicas, dentre elas, o estudo de nanopartículas que podem ser identificadas em uma escala de 1 nm a 8 mm, em meios líquidos e em condições ambientais (FARRE; BARCELÓ, 2012).

Logo, para obter imagens morfológicas, avaliar o tamanho e agregados em todas as amostras nanoestruturadas, foram preparadas soluções individuais, cuja concentração era de 0,05 µg/mL (0,5 µL de amostra diluída em 10mL de água Milli-Q) e a partir dessas, foram depositadas pequenas gotículas de cada amostra sobre um *Grid* e posteriormente, foram acondicionadas em um dessecador por 3 dias até a realização da leitura no equipamento. Após a dessacagem, a análise foi feita em modo sem contato com um cantilever TapAl-G, efetuado a uma taxa de varredura de 90 Hz.

3.2.7. Ensaios de degradação por espectroscopia UV-Vis

3.2.7.1. Degradação do Fotossensibilizador Diph-BTZ (FS)

Com a finalidade de avaliar a presença de espécies reativas de oxigênio (EROs) produzidas pela atividade fotodinâmica do fotossensibilizador (FS), foi proposto a utilização da técnica de espectroscopia do ultravioleta-visível (UV-Vis), na qual detecta os níveis de absorbância da amostra em relação ao tempo.

Para isso, foi preparado uma solução estoque de fotossensibilizador a uma concentração de 1000 µg/mL, cujo solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, foram feitas diluições padronizadas com concentração de 23,3 µg/mL em triplicata, para exposição das amostras à luz (câmara de luz UV LED) combinadas com um sistema de ventilação simples. As leituras realizadas em função do tempo, partiram do momento 0 (zero) min à 240 min.

3.2.7.2. Degradação do Azul de Metileno (AM)

Com o objetivo de possuir resultados comparativos a fim de demonstrar o fotobranqueamento do FS e certificar a sua geração de EROs, foi utilizado um outro agente fotossensibilizador com absorção no espectro de 670 nm e similarmente capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (WU et al., 2019)

Para isso, foi preparado uma solução estoque de azul de metileno a uma concentração de 100 µg/mL, cujo solvente utilizado foi o dimetilsulfóxido (DMSO). Posteriormente, foram feitas diluições padronizadas com concentração de 2,3 µg/mL em triplicata, para exposição das amostras à luz combinadas a um sistema de ventilação simples. As leituras realizadas em função do tempo, partiram do momento 0 (zero) min à 240 min.

3.2.7.3. Degradação do Azul de Metileno + Fotossensibilizador (AM+FS)

Em combinação dos dois compostos em solução com a intenção de averiguar seus comportamentos individuais e suas taxas de degradações; foram utilizadas dissoluções padronizadas (70 µL de cada amostra + 2860 µL de DMSO) em triplicata, para exposição das amostras à luz combinadas a um sistema de ventilação simples. As leituras realizadas em função do tempo, partiram do momento 0 (zero) min à 240 min.

3.2.7.4. Degradação da NP PCL_FS e NE_FS

Em interesse de avaliar a atividade fotodinâmica e tempo de duração do FS presente nas nanopartículas, foram realizadas dissoluções padronizadas em água com concentração de 5 µg/mL, para exposição das amostras à luz, combinadas a um sistema de ventilação simples. As leituras foram executadas em triplicata e avaliadas em função do tempo, partiram do momento 0 (zero) min à 240 min.

3.2.7.5. Degradação da NP PCL CTL e NE CTL dissolvidas em solução de FS

Na dimensão de observar o comportamento do FS na presença de nanopartículas, foram realizadas dissoluções individuais de 70µL de amostra em uma solução de FS com concentração de 23,3 µg/mL. Foram expostas à luz e combinadas a um sistema de ventilação simples. As leituras foram executadas em triplicata e avaliadas em função do tempo, partindo do momento 0 (zero) min à 240 min.

3.2.7.6. Degradação da NP PCL_FS e NE_FS dissolvidas em solução de AM

Em finalidade de examinar a atividade das nanopartículas carreadoras de FS em presença de uma solução de AM, foram realizadas dissoluções individuais de 70µL de amostra em uma solução de AM com concentração de 2,3 µg/mL. Foram expostas à luz e combinadas a um sistema de ventilação simples. As leituras foram executadas em triplicata e avaliadas em função do tempo, partindo do momento 0 (zero) min à 240 min.

3.2.7.7. Degradação da NP PCL CTL e NE CTL dissolvidas em solução de AM

Em razão de analisar o comportamento do AM na presença de nanopartículas, foram realizadas dissoluções individuais de 70µL de amostra em uma solução de AM com concentração de 2,3 µg/mL. Foram expostas à luz e combinadas a um sistema de ventilação simples. As leituras foram executadas em triplicata e avaliadas em função do tempo, partindo do momento 0 (zero) min à 240 min.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Síntese e Caracterização das nanopartículas

4.1.1. Estabilidade das partículas nanoestruturadas em função do tempo

A avaliação da estabilidade das partículas através do sistema DLS, permite avaliar a efetividade do processo de síntese, calcular a cinética do movimento browniano das partículas, bem como avaliar o diâmetro médio e sua distribuição no sistema coloidal, entre outros fatores abrangentes ao estudo.

A utilização de surfactantes e polímeros na metodologia de formação das nanocápsulas e nanoemulsões, são elementos cruciais para caracterização do tamanho e disposição das partículas em suspensão, já que podem influenciar em suas propriedades físico-químicas e morfológicas (POHLMANN et al., 2013), tal como o aumento da área de superfície ocasionada pela hidrofiliicidade e/ou hidrofobicidade dos tensoativos (LINO et al., 2020).

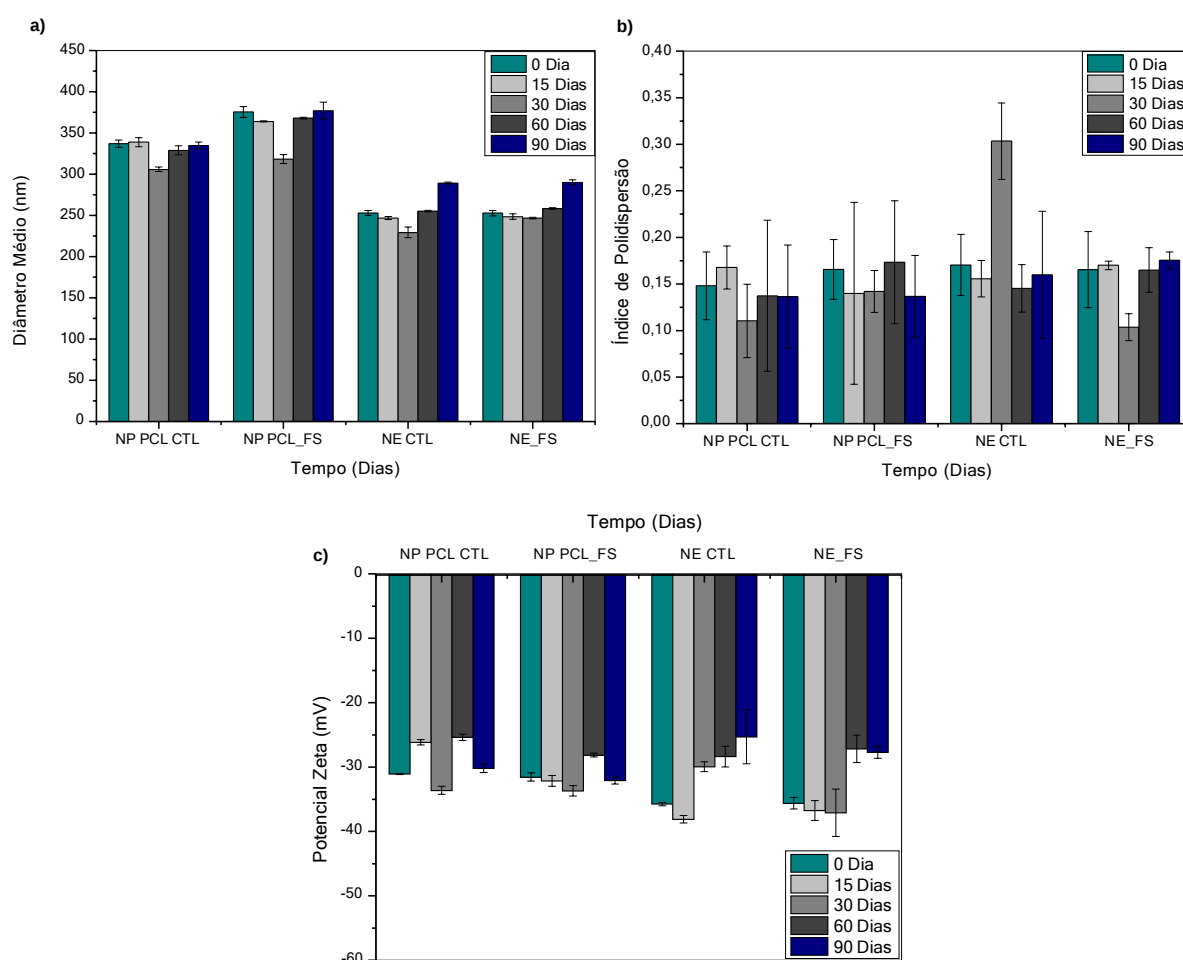
Como ilustrado na Figura 9a, as nanopartículas controle (NP PCL CTL) apresentaram um diâmetro médio inicial de ~340 nm e não apresentaram alterações significativas no diâmetro médio em função do tempo de armazenamento, sendo observado um diâmetro de ~325 nm após 90 dias de armazenamento. Para as nanopartículas contendo o FS, foi observado um ligeiro aumento no diâmetro médio quando comparado com as nanopartículas controle, o que pode ser atribuído a reorganização da matriz polimérica para acomodar o FS.

O diâmetro médio inicial foi de ~375nm nm e não foram observadas alterações significativas para este parâmetro em função do tempo de armazenamento. Os dados obtidos no presente trabalho corroboram com dados já publicados na literatura, por exemplo, Lino et al. (2020), produziram nanopartículas de poli-ε-caprolactona encapsulando β-caroteno e obtiveram diâmetro médio abaixo de 200 nm.

Já as NE CTL evidentemente tiveram instabilidade estrutural, resultando em variações de tamanhos ao longo dos dias (aprox. 25 nm), o que se deve por sua inconstância termodinâmica e desestabilização coloidal, possibilitando a formação de um sistema bifásico e agregados (WILSON et al., 2022), ao contrário das NE_FS que demonstraram tamanho inicial de ~225 nm com certa estabilidade em decorrência do tempo.

Outro parâmetro analisado foi o índice de polidispersão (PDI), que é um indicativo da homogeneidade da distribuição de tamanho das nanopartículas. A literatura preconiza, que sistemas coloidais com distribuição monodispersa apresentam valores 0,2. De acordo com a Figura 9b, é possível observar que todos os sistemas coloidais preparados, contendo ou não o FS, apresentaram PDI ($\leq 0,20$) durante os 90 dias de armazenamento, exceto para as nanoemulsão controle com 30 dias de armazenamento. Entretanto, embora tenha sido observado essa mudança no PDI, não foram observados aumento do diâmetro médio o que poderia indicar a formação de agregados. Resultados semelhantes foram obtidos por Danaei et al. (2018) e Lino et al. (2020).

Figura 9 - Análises de estabilidade das NP's e NE's em função do tempo (dias), considerando os dados de: a) diâmetro médio, b) índice de polidispersão e c) potencial zeta.



Fonte: Própria autoria

Já com relação ao potencial zeta (Fig. 9c) é possível visualizar que ambas espécies nanoestruturadas, apresentaram valores de cargas negativas na interface partícula-dispersante, e que baseado na literatura, pode ser explicado pela natureza

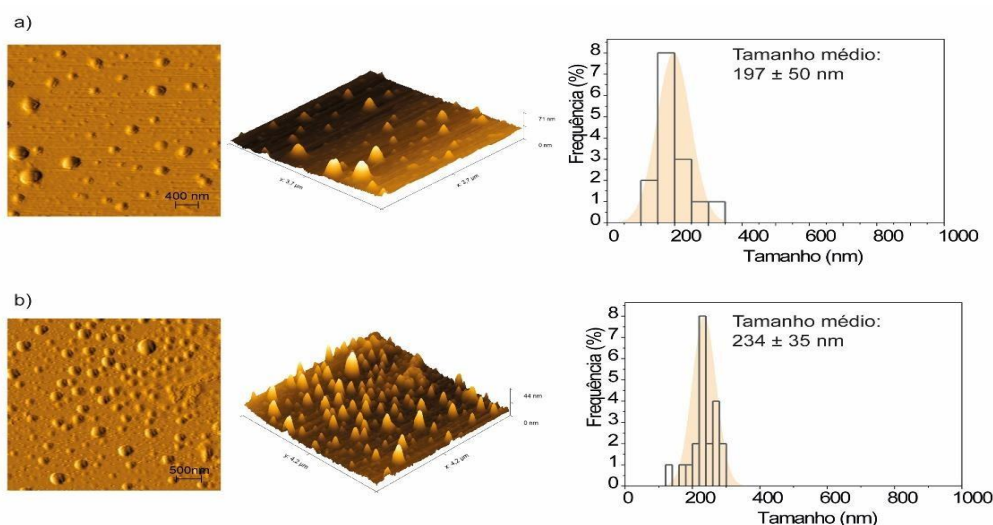
dos agentes utilizados em suas sínteses, como por exemplo o PCL nas NP's, Tween® 80 e Span® 60, que possuem grupos carboxílicos e carbonílicos em suas superfícies, sendo altamente oxidativos (BHATTACHARJEE, 2016; LINO et al., 2020).

Considerando os resultados dos ensaios, as NP PCL CTL e NE CTL mostraram-se com certa oscilação no potencial zeta em decorrência dos dias, o que provavelmente se deve pela degradação ordinária de seus componentes. Em contrapartida, nos primeiros 30 dias de armazenamento, as NP PCL_FS e NE_FS tiveram maior estabilidade em suas interfaces (-32 mV e -35 mV, respectivamente), por conterem um agente hidrofóbico em seu núcleo, dispondo de maiores forças repulsivas e evitando a formação de agregados (SCHAFFAZICK et al., 2003b).

4.1.2. Tamanho e morfologia das nanopartículas avaliadas no AFM

Na tentativa de reafirmar e endossar o tamanho médio, dispersão e topografia das nanopartículas, foram realizados ensaios com microscopia de força atômica, demonstrando que os tamanhos médios das NE_FS (Fig. 10a) e NP PCL_FS (Fig. 10b), correspondem a 197 ± 50 nm e 234 ± 35 nm, respectivamente, além de informar suas características esféricas e dispersão homogênea. Contudo, nota-se que há pequenas diferenças de diâmetro entre os resultados comparativos de DLS e AFM, o que pode ser explicado pela ausência de água das partículas avaliadas pelo sistema de microscopia de força atômica, já que foram dessecadas precedentemente (CAMPOS et al., 2018).

Figura 10 - Análise dimensional e de superfície morfológica das nanopartículas, considerando os dados de: a) NE_FS, b) NP PCL_FS.



Fonte: Própria autoria

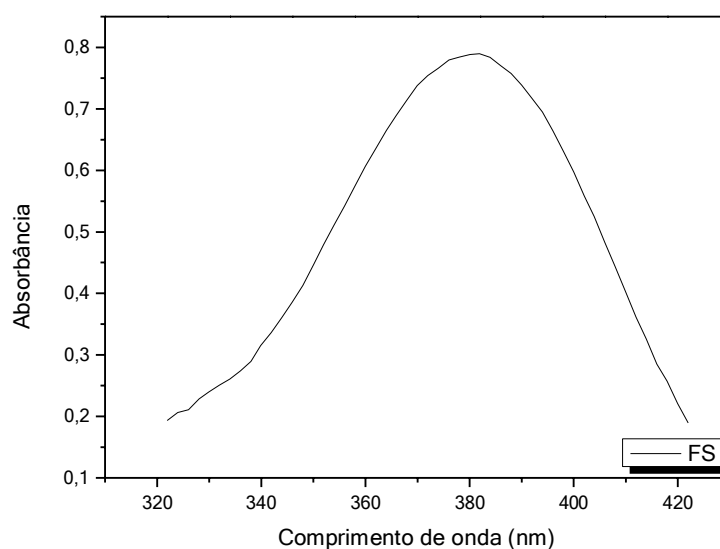
4.2. Caracterização do fotossensibilizador Diph-BTZ

4.2.1. Curva de absorção e calibração do FS Diph-BTZ

Sabe-se que os conjuntos de técnicas analíticas em laboratório correspondem às probabilidades, precisão dos resultados e a diminuição de incertezas durante os ensaios (PIMENTEL; NETO, 1996). Portanto, técnicas como curva de calibração e de absorção, são importantes parâmetros que determinam a natureza da amostra e a qualidade experimental.

A fim de avaliar a região de maior absorbância do FS, foi realizado uma varredura de 800 a 200 nm. De acordo com a figura 11, o FS Diph-BTZ teve seu maior pico de absorção na região do espectro compreendida em 380 nm, o que corresponde à cor violeta com maior frequência e energia (ANNE MARIE HELMENSTINE, 2020).

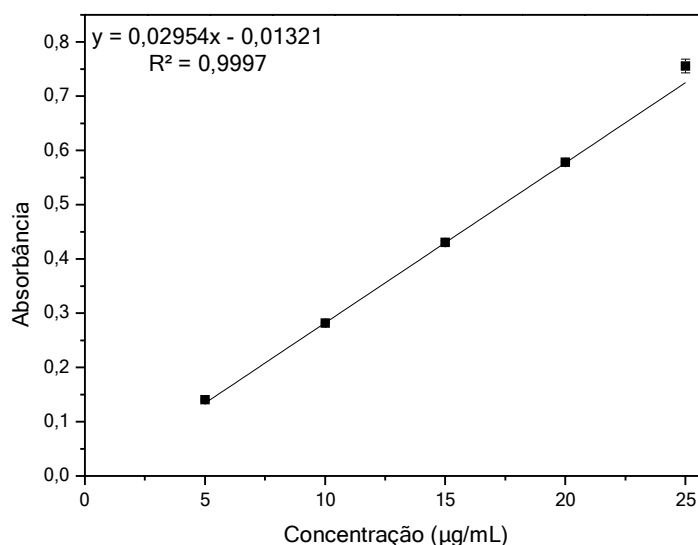
Figura 11 - Curva de Absorção do Fotossensibilizador Diph-BTZ em DMSO



Fonte: Própria autoria

Na figura 12, é possível observar que através do cálculo de regressão linear aliando-se ao desvio padrão e média, o coeficiente de determinação (R^2) está próximo de 1, (R^2 0,9997) representando linearidade na equação e nos pontos atribuídos (AUGUSTO; ANDRADE; CUSTODIO, 2000).

Figura 12 - Curva de calibração do Fotossensibilizador Diph-BTZ em DMSO



Fonte: Própria autoria

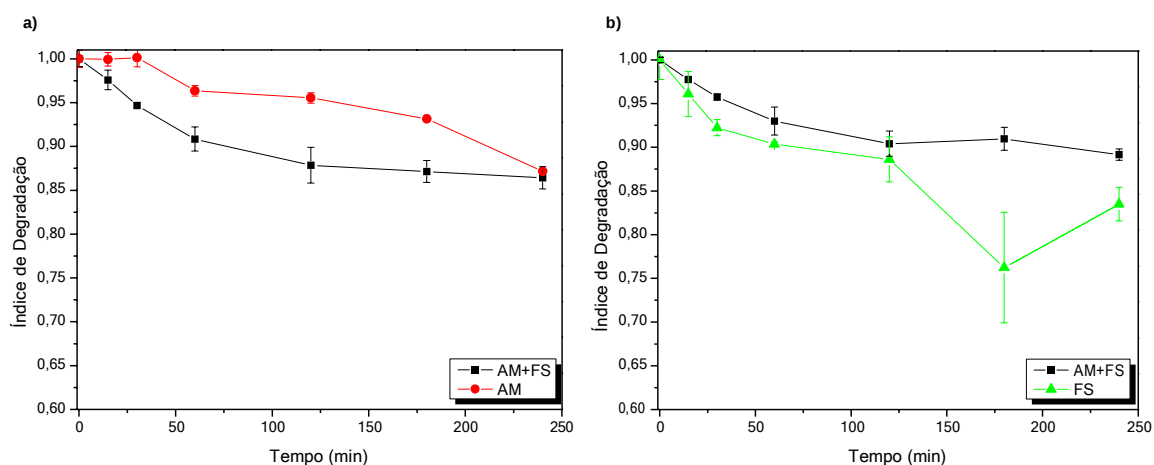
Já que as diferentes estruturas químicas presentes na amostra, são capazes de absorver e emitir luz, torna-se relevante a construção de uma curva de absorção, na qual configure em gráfico demonstrativo, o melhor comprimento de onda absorvido pelo analito, facilitando as futuras análises em equipamentos de espectrofotometria revelando suas características fotoativas.

4.3. Fotodegradação das partículas fotossensíveis e nanopartículas

4.3.1. Degradação do Azul de Metileno + Fotossensibilizador (AM+FS)

Com o intuito de validar a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) proveniente do FS, foi realizado um ensaio no qual reunia o fotoativo dissolvido à um outro corante fotossensível denominado como Azul de Metileno (AM) em proporções de volume iguais, para avaliar o comportamento e degradação de ambos os compostos em presença de luz e ventilação em função do tempo.

Figura 13 – Índices de degradação do azul de metileno e fotossensibilizador combinados em solução, considerando os dados de: a) solução de AM+FS contraposto ao AM e b) solução de AM+FS contraposto ao FS.



Fonte: Própria autoria

Foram elaborados dois gráficos (Fig. 13) que contemplam os resultados obtidos pelas pesquisas individuais de análises fotodegradativas realizadas em UV-Vis, com posterior conversão de dados para um índice de degradação criado pela autora, sendo: a divisão de todos os resultados de espectrofotometria (em razão da minutagem aplicada) pelo primeiro dado do tempo 0 (zero), considerando-o como um padrão referencial de 100% de rendimento de FS.

A figura 13a, apresenta informações sobre a degradação do AM quando está dissolvido ao FS (AM+FS) sendo comparado à uma distinta solução contendo somente AM. Enquanto a figura 13b, dispõe a degradação do FS quando está dissolvido ao AM (AM+FS) sendo contraposto à uma outra solução contendo somente FS.

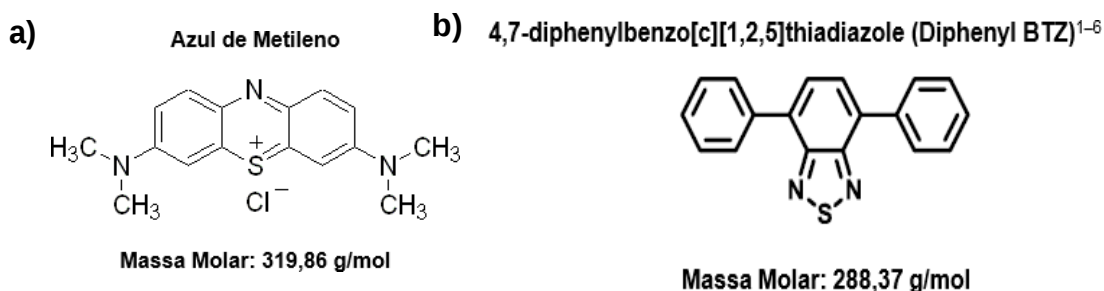
De imediato, é possível visualizar (Fig. 13a) que quando o AM está dissolvido ao FS (AM+FS), sua degradação ocorre de maneira muito mais rápida, o que comprova a geração de oxigênio singlete oriunda do FS, promovendo o fotobranqueamento do composto, ou seja, há um aumento na quantidade de $^1\text{O}_2$ nessa reação.

Todavia, quando o FS está dissolvido em AM (AM+FS), sua degeneração ocorre de maneira mais lenta quando comparado à sua análise individual (Fig. 13b). Em termos hipotéticos e admissíveis, isso decorre por conta das diferentes massas molares dos compostos (Fig. 14), pois moléculas maiores como no caso do AM,

acabam competindo com moléculas menores, reduzindo a absorção de luz do FS e consequentemente restringindo a sua formação de $^1\text{O}_2$.

Em continuidade à reflexão, provavelmente o rendimento quântico de oxigênio singlete (Φ) do AM, seja menor quando contrastado com o rendimento quântico do FS, tornando-se insuficiente para degradar o fotoativo em larga escala, porém sem descartar os dados indicativos do fotobranqueamento que ocorre na solução de AM+FS.

Figura 14 - Estruturas químicas dos compostos a) Azul de Metileno e b) FS - Diphenyl-BTZ.



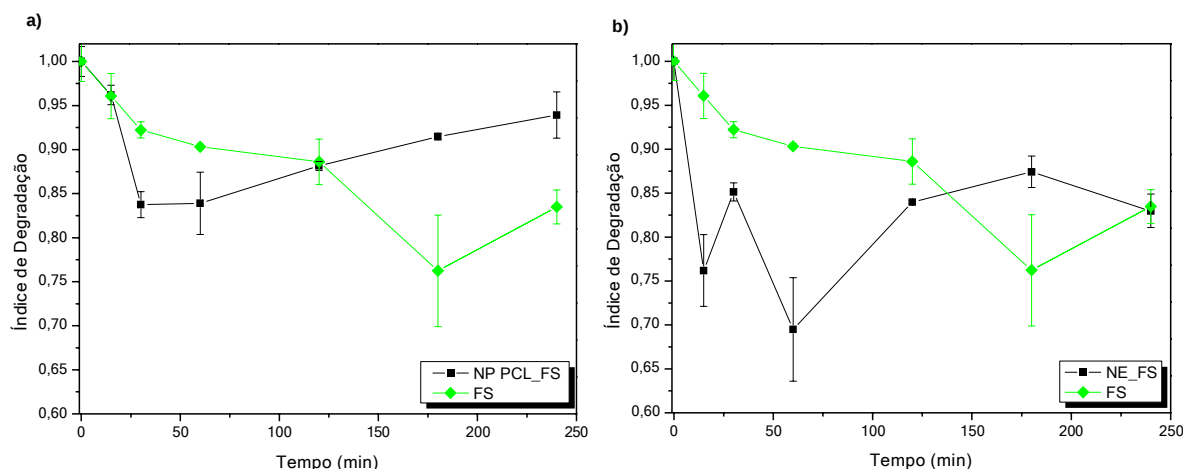
Fonte: Adaptado de Oliveira, 2014.

Fonte: Própria autoria, 2022.

4.3.2. Degradação das NP PCL_FS e NE_FS comparadas ao FS isolado

Visto que os diferentes tipos de nanopartículas possuem múltiplas vantagens e aplicações, sendo as mais reconhecidas nas áreas biomédicas, ambientais, tecnológicas e alimentícias, oferecendo utilidades como biocompatibilidade, carreação de princípios ativos, aumento de sua durabilidade e com baixo custo; o presente estudo avaliou as características e propriedades da encapsulação do FS a fim de comprovar sua eficiência para desígnio de formulações desinfetantes contra o SARS-CoV-2.

Figura 15 - Índices de degradação das nanopartículas com o ativo encapsulado, contrapostas ao FS isolado, considerando: a) NP PCL_FS e b) NE_FS.



Fonte: Própria autoria

Estudos afirmam que a nanoencapsulação de agentes fotossensibilizantes oferece benefícios tais como, aumento de sua estabilidade e seletividade, limitação da citotoxicidade e ecotoxicidade, enquadra-se como uma barreira protetora da degradação do agente resultando em um aumento de sua conservação e amplia a solubilidade do FS, modificando sua solubilidade aparente e facilitando sua solubilização água (MOKWENA et al., 2018).

Diante disso, foram feitos ensaios de degradação do FS não encapsulado com exposição à luz em função do tempo e ele deu-se para as nanopartículas com o agente encapsulado (NP PCL_FS e NE_FS) em objetivo de averiguar o tempo de degradação e permanência de cada molécula.

Na figura 15a, é possível visualizar que a degradação do FS não encapsulado ocorre de forma linear e gradativa, devido a absorção de radiação eletromagnética e produção de EROs, expressando o rápido fotobranqueamento do agente quando não possui barreira protetiva.

No entanto, o comportamento da NP PCL_FS demonstra que há prolongamento na atividade do FS em virtude do invólucro, bem como a detecção da produção de 1O_2 pelo seu aumento no índice de degradação em função do tempo, conforme relatado por Vasiljevic e colaboradores e Wang e colaboradores, as EROs quando formadas sofrem hipercromia, o que pode ser facilmente detectado pelos equipamentos de espectrofotometria de luz visível e fluorescência.

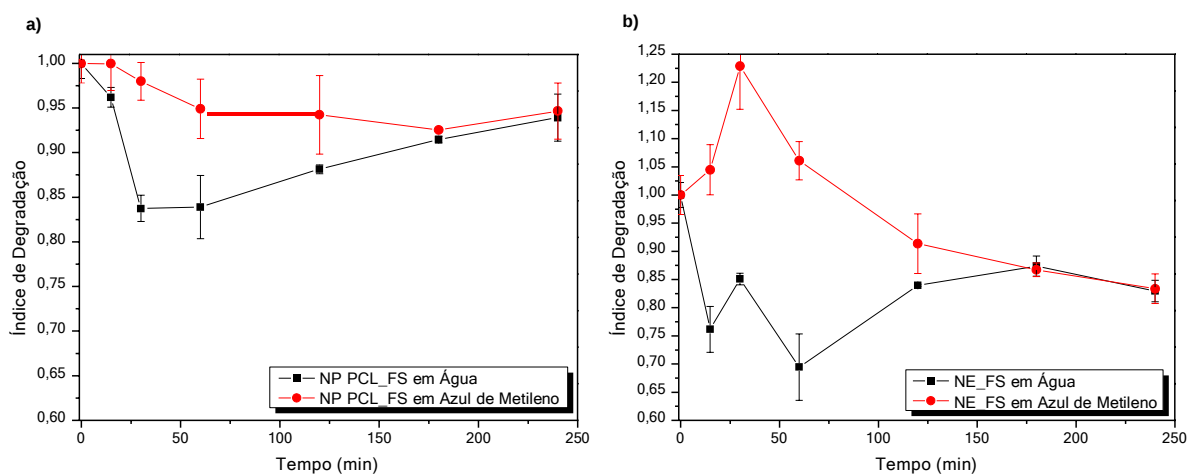
Não obstante, a NE_FS possui o mesmo desempenho e características das nanocápsulas (Fig. 15b), apenas apresentando variações em picos no índice de

degradação nos primeiros minutos de análise, o que pode ser explicado pela sua instabilidade termodinâmica e por uma provável liberação mais rápida do FS retido em seu interior, ocasionando em uma maior fração de EROs difundida ao meio (BRUXEL et al., 2012).

4.3.3. Degradação das nanopartículas diluídas em água comparadas às diluídas em azul de metileno

Reconhecidamente os solventes atuam como um importante elemento para as reações químicas ocorrerem, de modo que as propriedades intrínsecas dos compostos soluto-solvente, irão determinar a eficiência e qualidade da solução preparada. No caso das nanopartículas deste presente estudo, foram utilizados surfactantes e/ou polímeros que as atribuem características hidrofílicas, para que possam diluir facilmente em água e dispersantes polares.

Figura 16 - Índices de degradação das nanopartículas diluídas em água, contrapostas as nanopartículas diluídas em azul de metileno, considerando: a) NP PCL_FS e b) NE_FS.



Fonte: Própria autoria

No entanto, apesar de serem otimizadas para tal finalidade, se faz necessário ressaltar que elas terão atividades diferenciadas e específicas em alguns solventes, ou ainda poderão se comportar de maneira atípica com outros solutos dispersos no meio. Por isso, este ensaio reuniu as análises de degradação das nanopartículas diluídas em água e comparou com a degradação delas, diluídas em solução de azul de metileno.

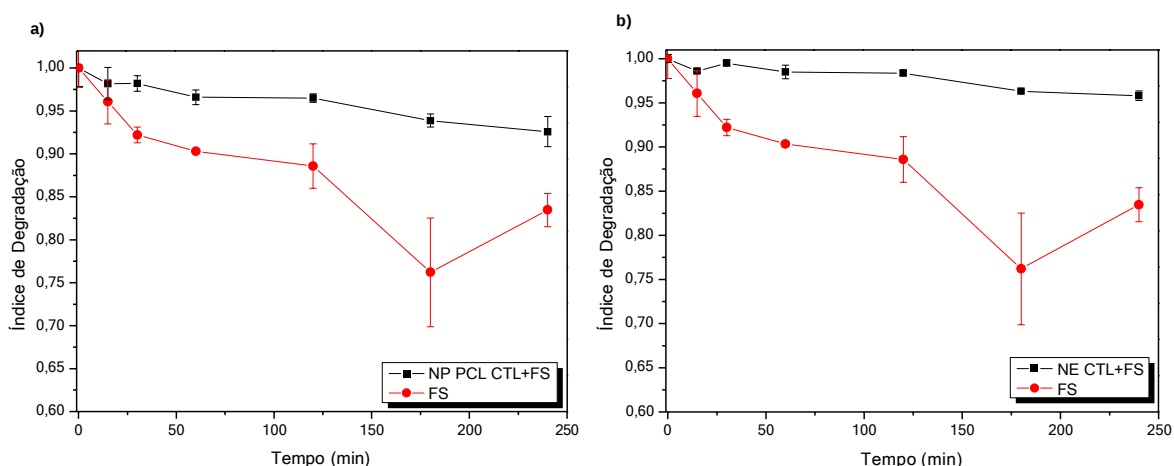
Na figura 16a e 16b, é possível notar que as NP PCL_FS e NE_FS dissolvidas em azul de metileno se degradam vagarosamente se comparadas as diluições em água e de maneira bem instigante, em determinadas minutagem as degenerações de

ambos os solventes (água e AM) acabam se assemelhando. Isso ocorre, porque o AM também é um componente fotossensível, o que motiva sua absorção de luz, diminuindo significativamente a disposição de radiação eletromagnética difusa à solução e, portanto, expandindo o tempo de desgaste das nanopartículas.

4.3.4. Degradação das NP PCL CTL+FS e NE CTL+FS comparadas ao FS isolado

Considerando que as análises anteriores se tratavam de estudos sobre o desempenho do FS encapsulado e sua eficiência na geração de oxigênio singlete, estes próximos ensaios associaram as nanopartículas controle, ou seja, aquelas que não possuem o fotoativo em seu interior, diluídas em solução com uma pequena porção de FS-Diph-BTZ e o último, foi avaliado em termos degradativo em função do tempo, tendo como contraste o fotobranqueamento do fotossensibilizante em condições isoladas.

Figura 17 - Índices de degradação das nanopartículas combinadas ao FS em solução, contrapostas ao FS isolado, considerando: a) NP PCL CTL e b) NE CTL.



Fonte: Própria autoria

Ponderando que através das observações desse ensaio, foi possível notar que o FS tem um menor efeito desgastante quando está em presença das nanopartículas (Fig. 17a e 17b), mesmo que este não esteja protegido pela encapsulação; é de grande importância examinar as propriedades físico-químicas dos compostos utilizados para a síntese das nanoestruturas e do próprio fotoativo.

As nanopartículas foram preparadas com agentes hidrofóbicos e hidrofílicos como o Span® 60 e Tween® 80, Myritol® e no caso das nanocápsulas, a policaprolactona (PCL). Portanto, haverá sistemas que possuem naturezas químicas

semelhantes ao FS. Desse modo, o resultado diminutivo do índice de degradação do fotoativo em contato com as nanopartículas, pode ser explicado por duas vias:

- i) Por interações intermoleculares entre o FS e as demais substâncias com propriedades semelhantes;
- ii) Adsorção superficial do FS nas estruturas das nanopartículas.

A primeira via pode ser considerada pela atração eletrostática entre fotossensibilizador e a policaprolactona (nanocápsula), e fotossensibilizador e Span 60® (nanoemulsão), já que são apolares e hidrofóbicos e/ou caso haja alguma desorganização nas matrizes das partículas, fazendo com que os íons dispersantes interajam com o FS.

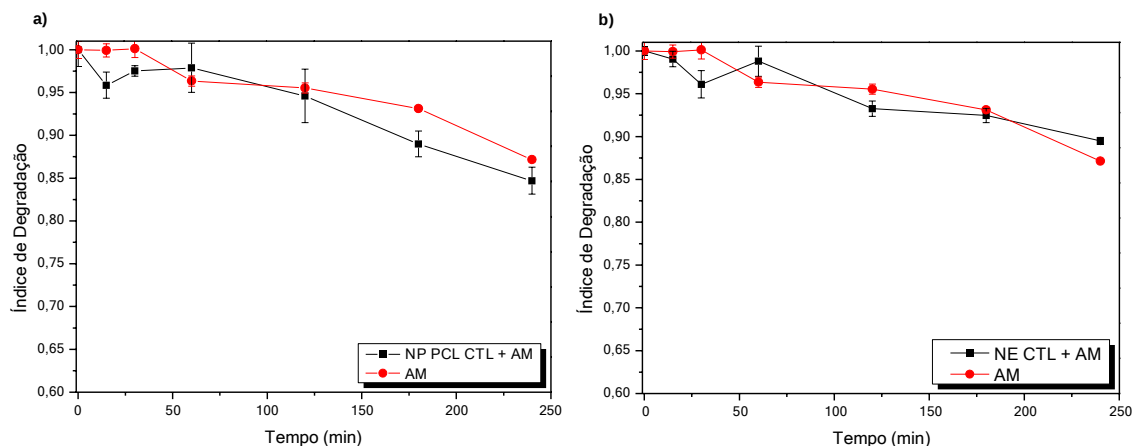
A segunda via, também é aceitável, pois segundo alguns pesquisadores, as nanopartículas podem reter uma pequena parcela de dispersantes em sua interface por conta dos tensoativos utilizados, principalmente se tiverem cargas e/ou tamanhos atrativos. Isso pode ocorrer, por meio da mudança do pH e temperatura do solvente, tal como a variação da pressão (HUA; BEVAN; FRECHETTE, 2018).

À vista disso, é notável que o FS de alguma forma está apresentando afinidade com as nanopartículas mesmo em meio dispersante e, portanto, sua degradação é reduzida em relação ao tempo.

4.3.5. Degradação das NP PCL CTL+AM e NE CTL+AM comparadas ao AM isolado

Com o mesmo objetivo da análise anterior, os ensaios de degradação do AM em contato com nanopartículas dispersas, visaram estudar as suas oscilações no índice degradativo de acordo com o tempo decorrido. Dessa forma, evidencia-se por intermédio dos gráficos (Fig. 18a e 18b), que o AM possui um comportamento singular quando combinado às nanopartículas, sendo perceptível o aumento de seu fotobranqueamento em decurso do tempo.

Figura 18 - Índices de degradação das nanopartículas combinadas ao AM em solução, contrapostas ao AM isolado, considerando: a) NP PCL CTL e b) NE CTL.



Fonte: Própria autoria

Contudo, essas alterações não são tão discrepantes quando comparadas a degeneração isolada do azul de metileno, transfigurando esses dados como variações desprezíveis, visto que, provavelmente o AM diluído não possui interações intermoleculares ou adsorptivas com as nanoestruturas como no cenário do FS, o que pode estar relacionado ao tamanho de sua molécula ou por alguma outra razão na qual ainda não foi identificada e presumida pela autora.

5. CONCLUSÕES

O presente estudo, foi capaz de avaliar e compreender as características de fotossensibilizadores e sua indução ao suprimir microrganismos, sintetizar e interpretar as propriedades das nanoestruturas, bem como a encapsulação de agentes fotossensíveis como componente chave para produção de desinfetantes.

A dissertação apresenta dados de dois sistemas nanocarreadores, que possuem diferentes propriedades em relação ao tamanho, estabilidade, composição química e técnicas de preparo. Através dos resultados adquiridos, foi assistido que dentre os complexos carreadores, as nanocápsulas poliméricas possuem maior estabilidade em função do tempo, devido as contribuições da natureza biodisponível, atóxica e protetiva que a policaprolactona apresenta.

Sua caracterização demonstrou que a homogeneidade das partículas, a estrutura morfológica de aparência esférica, bem como a baixa condição à formação de agregados, exprime grande utilidade para ser escolhida como alternativa para o desenvolvimento de novos desinfetantes sustentáveis com ação fotodinâmica.

Analizando outro parâmetro, segundo as informações obtidas neste trabalho, é possível entender o processo do fotobranqueamento, pois baseado na literatura e evidenciado através dos ensaios, esse sistema consiste na destruição da fonte geradora (FS) provocado pelo oxigênio singleto, ocasionando uma queda de concentração do corante em função do tempo.

Contudo, como já sabido, o oxigênio reativo apesar de ser potencialmente destrutivo às membranas celulares dos patógenos, resultando no expectável processo de assepsia, dispõe de um curto tempo de meia vida ($\sim 2\text{ns}$), tornando essencial a confecção de nanocarreadores capazes de aumentar sua persistência. Portanto, pode ser demonstrado por meio dos experimentos de estabilidade, o grande êxito da encapsulação do fotoativo, levando em conta os benefícios do aumento da hidrofiliabilidade e da ampliação do prazo de resistência do composto.

Do mesmo modo, foi permitido comprovar que o FS Diph-BTZ tem grande competência ao degradar outros compostos orgânicos como o azul de metileno, que similarmente possui características de fotoatividade e que obviamente se forem combinados dois tipos de fotossensibilizadores (aqui utilizando exemplo do AM e FS Diph-BTZ), resultará na elevação da quantidade de EROs formadas na solução.

Mediante a este trabalho e todas as ações realizadas no período de pesquisa, pode-se concluir que este estudo científico de cunho inovador, apresenta informações conceituadas a respeito da utilização de compostos nanoestruturados biodegradáveis e atóxicos, combinados a um método de indução fotodinâmica que utiliza luz visível e oxigênio molecular, para o desenvolvimento de novos produtos sanitizantes. Ressaltando que estes dados podem contribuir com a comunidade científica, incorporando novas tecnologias a favor da sociedade.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOUBAKR, H. A.; SHARAFELDIN, T. A.; GOYAL, S. M. **Stability of SARS-CoV-2 and other coronaviruses in the environment and on common touch surfaces and the influence of climatic conditions: A review - Aboubakr - 2021 - Transboundary and Emerging Diseases - Wiley Online Library.** Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/tbed.13707>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- ALMEIDA, A.; FAUSTINO, M. A. F.; NEVES, M. G. P. M. S. Antimicrobial Photodynamic Therapy in the Control of COVID-19. **Antibiotics**, v. 9, n. 6, p. 320, jun. 2020.
- ALVES, O. L. Nanotecnologia, nanociência e nanomateriais: quando a distância entre presente e futuro não é apenas questão de tempo. p. 18, 2004.
- ANDERSEN, K. G. et al. **The proximal origin of SARS-CoV-2 | Nature Medicine.** Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0820-9?fbclid=IwAR3w65RgLI01mVjIMQ2LKeZS4xUkLz5LRBinImTKRPOWSnCqIQWw_hDzR0>. Acesso em: 15 set. 2021.
- ANNE MARIE HELMENSTINE. **The Visible Spectrum: Wavelengths and Colors.** Disponível em: <<https://www.thoughtco.com/understand-the-visible-spectrum-608329>>. Acesso em: 17 jan. 2022.
- ASWATHANARAYAN, J. B.; VITTAL, R. R. Nanoemulsions and Their Potential Applications in Food Industry. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, p. 95, 2019.
- AUGUSTO, F.; ANDRADE, J. C. DE; CUSTODIO, R. Faixa linear de uma curva de calibração. **Revista Chemkeys**, n. 3, p. 1-8, 2000.
- BAJAJ, N. S.; JOSHI, R. A. Chapter 3 - Energy materials: synthesis and characterization techniques. In: DHOBLE, S. J. et al. (Eds.). **Energy Materials**. [s.l.] Elsevier, 2021. p. 61-82.
- BALTAZAR, L. M. et al. Antimicrobial photodynamic therapy: an effective alternative approach to control fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, 2015.
- BALU, S. et al. Degradation of Methylene Blue Dye in the Presence of Visible Light Using SiO₂@ α -Fe₂O₃ Nanocomposites Deposited on SnS₂ Flowers. **Materials**, v. 11, n. 6, p. 1030, 17 jun. 2018.
- BANOUN, H. Evolution of SARS-CoV-2: Review of Mutations, Role of the Host Immune System. **Nephron**, v. 145, n. 4, p. 392-403, 2021.
- BBC NEWS BRASIL. Delta, Gama, Beta: quais são as principais variantes da covid e quanta proteção as vacinas oferecem? **BBC News Brasil**, [s.d.].
- BELASCO, A. G. S.; FONSECA, C. D. DA. Coronavírus 2020. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 73, 27 mar. 2020.

- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential - What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, ago. 2016.
- BRUXEL, F. et al. Nanoemulsões como sistemas de liberação parenteral de fármacos. **Química Nova**, v. 35, p. 1827-1840, 2012.
- CAMPOS, E. V. R. et al. Carvacrol and linalool co-loaded in β -cyclodextrin-grafted chitosan nanoparticles as sustainable biopesticide aiming pest control. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 7623, 16 maio 2018.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Nossa História - Nossa História | Sobre | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/about/history/index.html>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Princípios de Epidemiologia | Lição 1 - Seção 11**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section11.html>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Tipos de coronavírus humanos | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/types.html>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 3 set. 2018.
- CIEPLIK, F. et al. Antimicrobial photodynamic therapy - what we know and what we don't. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 44, n. 5, p. 571-589, 3 set. 2018.
- COMBS, S. **June Almeida discovered coronaviruses decades ago—but got little recognition**. Disponível em: <<https://www.nationalgeographic.com/history/article/june-almeida-discovered-coronaviruses-decades-ago-little-recognition>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- CORMAN, V. M. et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR. **Eurosurveillance**, v. 25, n. 3, p. 2000045, 23 jan. 2020.
- COUTINHO, J. A. **Nanopartículas na entrega eficaz e segura de fármacos ao cérebro por via nasal**. [s.l: s.n.].
- CUI, J.; LI, F.; SHI, Z.-L. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 181-192, mar. 2019.
- DANAEI, M. et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. **Pharmaceutics**, v. 10, n. 2, p. 57, 18 maio 2018.
- DAVIES, M. J. Singlet oxygen-mediated damage to proteins and its consequences. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 305, n. 3, p. 761-770, 6 jun. 2003.
- DE OLIVEIRA, A. M. Produção de Nanopartículas Poliméricas com Tamanho

Controlado com Potencial Aplicação na Liberação Controlada de Agentes Antitumorais. p. 59, 2014.

DEDIEGO, M. L. et al. Coronavirus virulence genes with main focus on SARS-CoV envelope gene. **Virus Research**, Nidoviruses I. v. 194, p. 124-137, 19 dez. 2014.

DELGADO, J. M. F. Preparação e caracterização de nanotransportadores (nanocápsulas, nanoesferas, lipossomas e transportadores lipídicos nanoestruturados) sem substância ativa. p. 117, 2013.

DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, p. 351-371, 1 nov. 2002.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, p. 1520-1526, 2013.

DONNELLY, R. F.; MCCARRON, P. A.; TUNNEY, M. M. Antifungal photodynamic therapy. **Microbiological Research**, v. 163, n. 1, p. 1-12, 15 jan. 2008.

EVANGELISTA, H. et al. **Modeling the initial phase of SARS-CoV-2 deposition in the respiratory tract mimicked by the 11 C radionuclide**. [s.l: s.n.].

EZHILARASI, P. et al. Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components: A Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 628-647, 1 mar. 2013.

FARRÉ, M.; BARCELÓ, D. Introduction to the Analysis and Risk of Nanomaterials in Environmental and Food Samples. In: **Comprehensive Analytical Chemistry**. [s.l.] Elsevier, 2012. v. 59p. 1-32.

FIOCRUZ, C. **“Covid-19 não é pandemia, mas sindemia”: o que essa perspectiva científica muda no tratamento | CEE Fiocruz**. Disponível em: <<https://cee.fiocruz.br/?q=node/1264>>. Acesso em: 15 set. 2021.

GOZZO, M. **June Almeida: a doutora que não terminou o ensino médio e identificou o primeiro coronavírus**. Disponível em: <<https://coronavirus.butantan.gov.br/ultimas-noticias/june-almeida-a-doutora-que-nao-terminou-o-ensino-medio-e-identificou-o-primeiro-coronavirus>>. Acesso em: 15 set. 2021.

GRISOTTI, M. Doenças infecciosas emergentes e a emergência das doenças: uma revisão conceitual e novas questões. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 15, p. 1095-1104, jun. 2010.

HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: a bright new technique to kill resistant microbes. **Current Opinion in Microbiology**, Antimicrobials • Microbial systems biology. v. 33, p. 67-73, 1 out. 2016.

HARVEY, W. T. et al. SARS-CoV-2 variants, spike mutations and immune escape. **Nature Reviews Microbiology**, v. 19, n. 7, p. 409-424, jul. 2021.

- HASEGAWA, G. K. F. **ESTUDO DA POTENCIALIDADE DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA (TFDA) NA DESINFECÇÃO DE ÁGUA.** Trabalho de Conclusão de Curso—Curitiba: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, 2012.
- HILLEN, H. S. et al. Structure of replicating SARS-CoV-2 polymerase. **Nature**, v. 584, n. 7819, p. 154-156, ago. 2020.
- HOLKEM, A. et al. Técnicas de preparação de sistemas nanotecnológicos aplicados a alimentos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 87, 15 dez. 2015.
- HOO, C. M. et al. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 10, n. 1, p. 89-96, 1 dez. 2008.
- HORNYAK, G. L. et al. In: **Introduction to Nanoscience**. [s.l.] CRC Press, 2008.
- HU, B., GUO, H., ZHOU, P. et al. Characteristics of SARS-CoV-2 and COVID-19. **Nat Rev Microbiol** v. 19, p. 141-154 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41579-020-00459-7>. HOO, C. M. et al. **A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions | SpringerLink**. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11051-008-9435-7>>. Acesso em: 12 jan. 2022.
- HUA, X.; BEVAN, M. A.; FRECHETTE, J. Competitive Adsorption between Nanoparticles and Surface Active Ions for the Oil-Water Interface. **Langmuir**, v. 34, n. 16, p. 4830-4842, 24 abr. 2018.
- INSTRUMENTS, M. **Tech Note: Zeta potential - An introduction in 30 minutes**. Malvern Instruments, , 1 mar. 2005. Disponível em: <<https://www.research.colostate.edu/wp-content/uploads/2018/11/ZetaPotential-Introduction-in-30min-Malvern.pdf>>
- INTERMOUNTAIN HEALTHCARE. **What's the difference between a pandemic, an epidemic, endemic, and an outbreak?** Disponível em: <<https://intermountainhealthcare.org/blogs/topics/live-well/2020/04/whats-the-difference-between-a-pandemic-an-epidemic-endemic-and-an-outbreak/>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- JAISWAL, N. K.; SAXENA, S. K. Classical Coronaviruses. **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19)**, p. 141-150, 30 abr. 2020.
- KASHEF, N.; HUANG, Y.-Y.; HAMBLIN, M. R. Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale. **Nanophotonics**, v. 6, n. 5, p. 853-879, ago. 2017.
- KNOX, J. P.; DODGE, A. D. Singlet oxygen and plants. **Phytochemistry**, v. 24, n. 5, p. 889-896, 1 jan. 1985.
- KONG, I. Chapter 7 - Polymers with Nano-Encapsulated Functional Polymers. In:

- THOMAS, S.; SHANKS, R.; CHANDRASEKHARAKURUP, S. (Eds.). . **Design and Applications of Nanostructured Polymer Blends and Nanocomposite Systems**. Micro and Nano Technologies. Boston: William Andrew Publishing, 2016. p. 125-154.
- KRATZEL, A. et al. Temperature-dependent surface stability of SARS-CoV-2. **The Journal of Infection**, v. 81, n. 3, p. 452-482, set. 2020.
- KRIEGER-LISZKAY, A. Singlet oxygen production in photosynthesis. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 411, p. 337-346, 1 jan. 2005.
- KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 1 out. 2018.
- LAM, T. T.-Y. et al. Identifying SARS-CoV-2-related coronaviruses in Malayan pangolins. **Nature**, v. 583, n. 7815, p. 282-285, jul. 2020.
- LANA, R. M. et al. Emergência do novo coronavírus (SARS-CoV-2) e o papel de uma vigilância nacional em saúde oportuna e efetiva. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 36, p. e00019620, 13 mar. 2020.
- LI, J. et al. Virus-Host Interactome and Proteomic Survey Reveal Potential Virulence Factors Influencing SARS-CoV-2 Pathogenesis. **Med**, v. 2, n. 1, p. 99- 112.e7, 15 jan. 2021.
- LIM, J. et al. Characterization of magnetic nanoparticle by dynamic light scattering. **Nanoscale Research Letters**, v. 8, n. 1, p. 381, 8 set. 2013.
- LIMA, M. L. S. O. et al. A QUÍMICA DOS SANEANTES EM TEMPOS DE COVID-19: VOCÊ SABE COMO ISSO FUNCIONA? **Química Nova**, v. 43, p. 668-678, 29 jun. 2020.
- LINO, R. C. et al. Development and Characterization of Poly- ϵ -caprolactone Nanocapsules Containing β -carotene Using the Nanoprecipitation Method and Optimized by Response Surface Methodology. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 63, 16 out. 2020.
- LUNA, E. J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 5, p. 229-243, dez. 2002.
- MAGONOV, S. VISUALIZATION OF POLYMERS AT SURFACES AND INTERFACES WITH ATOMIC FORCE MICROSCOPY. In: **Handbook of Surfaces and Interfaces of Materials**. [s.l.] Elsevier, 2001. p. 393-430.
- MAHMOUDI, M. et al. Controlled Release 7-Methoxytacrine-Polycaprolactone Nanocapsules Drug-Delivery System for Alzheimer's Disease Treatment: Synthesis and Physico-Chemical Characterization. **Journal of Polymers and the Environment**, 26 nov. 2021.

- MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 8, p. 1518-1526, 2015.
- MANIASSO, N. Ambientes micelares em química analítica. **Química Nova**, v. 24, p. 87-93, fev. 2001.
- MARCONE, G. P. DE S. NANOTECNOLOGIA E NANOCIÊNCIA: ASPECTOS GERAIS, APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS NO CONTEXTO DO BRASIL. **Perspectiva da Ciência e Tecnologia**, v. 07, n. 2, p. 1-24, 2015.
- MARTÍNEZ-MUÑOZ, O. I.; OSPINA-GIRALDO, L. F.; MORA-HUERTAS, C. E. **Nanoprecipitation: Applications for Entrapping Active Molecules of Interest in Pharmaceuticals**. [s.l.] IntechOpen, 2020.
- MARTINS, T. P. C. **Nanoparticles as carrier systems for protein delivery**. Dissertação de mestrado—[s.l.] Universidade de Lisboa, 15 out. 2019.
- MENACHO, F. P. **DENDRIMEROS PAMAM**. Ariquemes - RS: Faculdade de Educação e Meio Ambiente, 2012.
- MOKWENA, M. G. et al. A review of nanoparticle photosensitizer drug delivery uptake systems for photodynamic treatment of lung cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 22, p. 147-154, jun. 2018.
- MÜLLER-BREITKREUTZ, K. et al. Inactivation of viruses by chemically and photochemically generated singlet molecular oxygen. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 30, n. 1, p. 63-70, 1 set. 1995.
- MURAKAMI, S. et al. Detection and Characterization of Bat Sarbecovirus Phylogenetically Related to SARS-CoV-2, Japan. **Emerging Infectious Diseases**, v. 26, n. 12, p. 3025-3029, dez. 2020.
- NEWMAN, T. **Coronaviruses: Definition, COVID-19, SARS, MERS**. Disponível em: <<https://www.medicalnewstoday.com/articles/256521>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- NOBRE, A. F. S. et al. Primeira detecção de coronavírus humano associado à infecção respiratória aguda na Região Norte do Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 5, n. 2, p. 37-41, jun. 2014.
- NYOKONG, T.; AHSEN, V. **Photosensitizers in Medicine, Environment, and Security**. [s.l.] Springer Science & Business Media, 2012.
- OLIVEIRA, A. M. DE. Produção de Nanopartículas Poliméricas com Tamanho Controlado com Potencial Aplicação na Liberação Controlada de Agentes Antitumorais. p. 59, 2014.
- DE OLIVEIRA, N. M. **Sorção de Corantes em Biomassa seca das Macrófitas Aquáticas *Salvinia* sp. e *Pistia stratiotes***. Dissertação de mestrado—UFRJ: Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2014.

- ONU NEWS. **Casos globais de Covid-19 aumentam pela quarta semana consecutiva**. Disponível em: <<https://news.un.org/pt/story/2021/03/1745542>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Transmissão do SARS-CoV-2: implicações para as precauções de prevenção de infecção**. OPAS, , 9 jul. 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/52472/OPASWBRACOVID-1920089_por.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 15 set. 2021
- PIMENTEL, M. F.; NETO, B. DE B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. v. 19, n. 3, p. 268-277, 1996.
- POHLMANN, A. R. et al. Poly(ϵ -caprolactone) microcapsules and nanocapsules in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 5, p. 623-638, maio 2013.
- QIU, Y.; XU, K. Functional studies of the coronavirus nonstructural proteins. **STEMedicine**, v. 1, n. 2, p. e39-e39, 21 mar. 2020.
- RAMOS, I. M. F. C. **Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2018.
- RATNESAR-SHUMATE, S. et al. Simulated Sunlight Rapidly Inactivates SARS-CoV-2 on Surfaces. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 2, p. 214-222, 29 jun. 2020.
- REIS, C. P. et al. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, mar. 2006.
- RIBEIRO, J. et al. Avaliação da atividade fotodinâmica de porfirinas para uso em terapia fotodinâmica através da fotoxidação de triptofano. **Ecletica Química - ECLET QUIM**, v. 32, 1 jan. 2007.
- RIDDELL, S. et al. The effect of temperature on persistence of SARS-CoV-2 on common surfaces. **Virology Journal**, v. 17, n. 1, p. 145, 7 out. 2020.
- RONCHI, L. M. et al. INFLUÊNCIA DA AGREGAÇÃO E DO FOTOBRANQUEAMENTO NA ATIVIDADE FOTODINÂMICA DE PROTOPORFIRINA DE MAGNÉSIO. n. 2, p. 8, 2007.
- RONSEIN, G. E. et al. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. **Química Nova**, v. 29, p. 563-568, jun. 2006.
- ROSSIN, A. R. DE S. et al. TERAPIA FOTODINÂMICA EM ELETROFIAÇÃO: REVISÃO DE TÉCNICAS E APLICAÇÕES. **Química Nova**, v. 43, p. 613-622,

29 jun. 2020.

- RULE WIGGINTON, K. et al. Oxidation of Virus Proteins during UV254 and Singlet Oxygen Mediated Inactivation. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 14, p. 5437-5443, 15 jul. 2010.
- SALATIN, S. et al. Development of a nanoprecipitation method for the entrapment of a very water soluble drug into Eudragit RL nanoparticles. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 12, n. 1, p. 1-14, fev. 2017.
- SARKAR, J.; GUHA, R. Infectivity, virulence, pathogenicity, host-pathogen interactions of SARS and SARS-CoV-2 in experimental animals: a systematic review. **Veterinary Research Communications**, v. 44, n. 3, p. 101-110, 1 nov. 2020.
- 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, out. 2003.
- SCHMALTZ, C.; SANTOS, J. V. D.; GUTERRES, S. S. NANOCÁPSULAS COMO UMA TENDÊNCIA PROMISSORA NA ÁREA COSMÉTICA: A IMENSA POTENCIALIDADE DESTES PEQUENOS GRANDES RECURSOS. p. 6, 2005.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 69, dez. 2019.
- SCHOEMAN, D.; FIELDING, B. C. Coronavirus envelope protein: current knowledge. **Virology Journal**, v. 16, n. 1, p. 69, 27 maio 2019.
- SEBASTIÃO PRATAVIEIRA. **Tópicos em Biofotônica - Diagrama de Jablonski**. YouTube, 26 maio 2020. Disponível em: <<https://www.youtube.com/watch?v=5F5rvakvwlk>>
- SERWAŃSKA-LEJA, K.; LEWANDOWICZ, G. Polymer Biodegradation and Biodegradable Polymers - a Review. **Polish Journal of Environmental Studies**, v. 19, 1 jan. 2010.
- SHANG, J. et al. Structural basis of receptor recognition by SARS-CoV-2 | Nature. p. 221-224, 30 mar. 2020.
- SIMABUCO, F. M. et al. Molecular mechanisms and pharmacological interventions in the replication cycle of human coronaviruses. **Genetics and Molecular Biology**, v. 44, 23 nov. 2020.
- SOLANS, C.; MORALES, D.; HOMS, M. Spontaneous emulsification. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 22, p. 88-93, abr. 2016.
- SOUTO, E. B. et al. Nanopartículas de lípidios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial. **Química Nova**, v. 34, p. 1762-1769, 2011.
- SRIVASTAVA, N.; SAXENA, S. K. Prevention and Control Strategies for SARS-CoV-2 Infection. In: SAXENA, S. K. (Ed.). **Coronavirus Disease 2019 (COVID-19): Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, and Therapeutics**. Medical

Virology: From Pathogenesis to Disease Control. Singapore: Springer, 2020. p. 127-140.

THE NATIONAL INSTITUTE FOR OCCUPATIONAL SAFETY AND HEALTH. **Healthcare Workers: Infectious Agents | NIOSH | CDC**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/niosh/topics/healthcare/infectious.html>>. Acesso em: 10 out. 2022.

TOMA, H. E.; ARAKI, K. Nanotecnologia: o gigante e promissor mundo do muito pequeno. **Ciência Hoje**, v. 37, n. 217, p. 24-31, jul. 2005.

TOREZAN, L.; NIWA, A. B. M.; FESTA NETO, C. Terapia fotodinâmica em dermatologia: princípios básicos e aplicações. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 84, p. 445-459, out. 2009.

UJVARI, S. C. A história da disseminação dos microrganismos. **Estudos Avançados**, v. 22, n. 64, p. 171-182, dez. 2008.

VASILJEVIC, Z. Z. et al. Photocatalytic degradation of methylene blue under natural sunlight using iron titanate nanoparticles prepared by a modified sol-gel method. **Royal Society Open Science**, v. 7, n. 9, p. 200708, 2020.

VEIGA-NETO, A. Mais uma Lição: sindemia covídica e educação. **Educação & Realidade**, v. 45, 11 jan. 2021.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99-103, mar. 2016.

WANG, J. et al. Detection and analysis of reactive oxygen species (ROS) generated by nano-sized TiO₂ powder under ultrasonic irradiation and application in sonocatalytic degradation of organic dyes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 177-183, 1 jan. 2011.

WANG, J. et al. Detection and analysis of reactive oxygen species (ROS) generated by nano-sized TiO₂ powder under ultrasonic irradiation and application in sonocatalytic degradation of organic dyes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, n. 1, p. 177-183, 1 jan. 2011.

WANG, Z. et al. **Transmission and prevention of SARS-CoV-2 | Biochemical Society Transactions | Portland Press**. Disponível em: <<https://portlandpress.com/biochemsoctrans/article-abstract/48/5/2307/226726/Transmission-and-prevention-of-SARS-CoV-2?redirectedFrom=fulltext>>. Acesso em: 15 set. 2021.

WEISS, S. R.; NAVAS-MARTIN, S. Coronavirus Pathogenesis and the Emerging Pathogen Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 69, n. 4, p. 635-664, dez. 2005.

WILSON, R. J. et al. Nanoemulsions for drug delivery. **Particuology**, Natural and Biomimetic Particles in Bio-applications. v. 64, p. 85-97, 1 maio 2022.

- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Classification of Omicron (B.1.1.529): SARS-CoV-2 Variant of Concern**. Disponível em: <[https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-\(b.1.1.529\)-sars-cov-2-variant-of-concern](https://www.who.int/news/item/26-11-2021-classification-of-omicron-(b.1.1.529)-sars-cov-2-variant-of-concern)>. Acesso em: 6 fev. 2022.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Middle East respiratory syndrome coronavirus (MERS-CoV)**. Disponível em: <https://www.who.int/health-topics/middle-east-respiratory-syndrome-coronavirus-mers#tab=tab_2>. Acesso em: 15 set. 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Naming the coronavirus disease (COVID-19) and the virus that causes it**. Disponível em: <[https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-\(covid-2019\)-and-the-virus-that-causes-it](https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019/technical-guidance/naming-the-coronavirus-disease-(covid-2019)-and-the-virus-that-causes-it)>. Acesso em: 15 set. 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Tracking SARS-CoV-2 variants**. Disponível em: <<https://www.who.int/en/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants/>>. Acesso em: 15 set. 2021.
- WOZNIAK, A.; GRINHOLC, M. Combined Antimicrobial Activity of Photodynamic Inactivation and Antimicrobials-State of the Art. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 930, 2018.
- WU, D. et al. The SARS-CoV-2 outbreak: What we know. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 94, p. 44-48, 1 maio 2020.
- WU, P.-T. et al. Methylene-Blue-Encapsulated Liposomes as Photodynamic Therapy Nano Agents for Breast Cancer Cells. **Nanomaterials**, v. 9, n. 1, p. 14, jan. 2019.
- XIA, S. et al. The role of furin cleavage site in SARS-CoV-2 spike protein-mediated membrane fusion in the presence or absence of trypsin. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 12 jun. 2020.
- XILING, G. et al. In vitro inactivation of SARS-CoV-2 by commonly used disinfection products and methods. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 2418, dez. 2021.
- YAN, Y. et al. The First 75 Days of Novel Coronavirus (SARS-CoV-2) Outbreak: Recent Advances, Prevention, and Treatment. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 7, p. 2323, jan. 2020.
- ZHANG, S. et al. The novel coronavirus (SARS-CoV-2) infections in China: prevention, control and challenges. **Intensive Care Medicine**, v. 46, n. 4, p. 591-593, 1 abr. 2020.
- ZHANG, W. Nanoparticle Aggregation: Principles and Modeling. In: CAPCO, D. G.; CHEN, Y. (Eds.). . **Nanomaterial**. Advances in Experimental Medicine and Biology. Dordrecht: Springer Netherlands, 2014. v. 811p. 19-43.
- ZHENG, J. SARS-CoV-2: an Emerging Coronavirus that Causes a Global Threat. **International Journal of Biological Sciences**, v. 16, n. 10, p. 1678-1685, 15

mar. 2020.

ZHOU, J. et al. **Infection of bat and human intestinal organoids by SARS-CoV-2 | Nature Medicine**. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41591-020-0912-6?fbclid=IwAR3DdpYUhzQmGRB2BRvs4Efd29QCy0H4j-_5htnA3lBqC9b65hgl_29Qb3l>. Acesso em: 15 set. 2021.

ZHOU, P. et al. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. **Nature**, v. 579, n. 7798, p. 270-273, mar. 2020.