



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS UNIVERSITÁRIO REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Patrícia Sangaletti

**Planejamento, síntese e caracterização de plataformas nanoestruturadas para aplicação
em Terapia Fotodinâmica e Terapia Fototérmica**

Florianópolis

2024

Patrícia Sangaletti

**Planejamento, síntese e caracterização de plataformas nanoestruturadas para aplicação
em Terapia Fotodinâmica e Terapia Fototérmica**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientadora: Dra. Adriana Passarella Gerola

Florianópolis

2024

Sangaletti, Patrícia

Planejamento, síntese e caracterização de plataformas nanoestruturadas para aplicação em Terapia Fotodinâmica e Terapia Fototérmica / Patrícia Sangaletti ; orientadora, Adriana Passarella Gerola, 2024.

197 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. terapia fotodinâmica e fototérmica. 3. fotoquímica. 4. nanopartículas de ouro. 5. nanotecnologia. I. Gerola, Adriana Passarella. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

Patrícia Sangaletti

**Planejamento, síntese e caracterização de plataformas nanoestruturadas para aplicação em
Terapia Fotodinâmica e Terapia Fototérmica**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 02 de agosto de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Diogo Silva Pellosi, Dr.

Universidade Federal do Paraná - UFPR

Prof. Vanderlei Gageiro Machado, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Hernán Francisco Terenzi, Dr.

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Hueder Paulo Moisés de Oliveira, Dr.

Universidade Federal do ABC – UFABC

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Química.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Profa. Adriana Passarella Gerola, Dra.

Orientadora

Florianópolis, 2024.

À Eladir, ao Ademar, à
Larissa, ao Nathan, e à Nadir,
por todo o apoio e incentivo concedidos a mim.

AGRADECIMENTOS

É difícil encontrar palavras suficientes que possam expressar minha infinita gratidão a todos aqueles que contribuíram com conhecimento, afeto, lealdade, intelecto e resiliência na concretização deste sonho chamado Doutorado.

De início, agradeço a Deus por ter me dado a oportunidade de chegar até aqui, uma menina que, em seus primeiros anos de escola não possuía condições financeiras nem mesmo de realizar um curso básico de informática, hoje alcança um dos mais altos níveis de estudo.

Agradeço especialmente à mulher mais inteligente que conheço, minha orientadora Dra. Adriana Gerola. Sem ela, nada disso teria sido realizado, sem o seu brilhante intelecto e sua compreensão e apoio incondicionais com que pude contar a todo momento. Adri, jamais esquecerei de tudo que fizestes por mim, estarás sempre em meu coração. No mesmo sentido, demonstro minha gratidão ao Professor Faruk Nome (*in memoriam*), um ser humano ímpar, que há onze anos atrás me deu a oportunidade de ingressar no LaCFI e iniciar minha carreira acadêmica. “[...] *Em relação a fazer o mestrado no LACFI: Você será sempre aceita com felicidade no LACFI!*” são palavras que nunca se apagarão da minha mente.

Aos meus pais, Eladir e Ademar, agradeço pela minha criação, os valores que a mim foram passados, por todo apoio durante estes anos investidos em estudo e educação, em especial à minha mãe, que entendeu e me ajudou nas muitas vezes que precisei de tempo e espaço para estudar. À minha irmã, Larissa, por toda a amizade, o amor e alegria com que dividimos a vida, por ter apoiado minhas escolhas e por sempre estar lá quando eu precisei; por todos os passeios, risadas, cafés, trilhas, cachoeiras e aventuras que compartilhamos. Ao Nathan, meu companheiro, que sempre disse orgulhosamente a todos a sua volta que se orgulhava da minha formação acadêmica, te agradeço por tudo que você fez e faz por mim, por ter me apoiado, por ter segurado minhas mãos quando eu achei que as situações não tinham solução, por ter estado ao meu lado nos momentos bons e ruins, por ter me acompanhado em um congresso (mesmo sem entender quase nada), por me dar carinho, confiança, amor, e por sempre lutar por nós. Amo você, te agradeço infinito por tudo. Também não posso deixar de agradecer ao meu anjo da guarda, minha madrinha de batismo Nadir Possamai Della Guollo, por todas as orações que fez por mim, por todas as conversas, apoio, carinho e por sempre torcer por mim. Também te amo, madrinha. Muito obrigada! Aos meus amiguinhos de quatro patas, Manu e Manuel.

Um agradecimento especial vai para os grandes amigos que fiz durante esta jornada, dentre eles Larissa, Laíze, Catiunaiara, William, Renata, Matheus, e aos demais colegas dos

laboratórios 312 e 203. A amizade de vocês foi essencial para que tudo isso fosse possível, e tornou tudo muito mais leve. Agradeço à Renata e Claudiana pela colaboração na realização de alguns dos experimentos que compõem esta Tese, muito obrigada meninas! Agradeço também ao Professor Dr. Luis Malacarne pela realização dos experimentos de Lentes Térmicas, ao Professor Dr. Alfeu Zanotto pelos testes biológicos e ao Professor Dr. Adolfo Horn pelos testes de ressonância paramagnética.

Agradeço aos professores que compõem a banca pelo aceite do convite.

Aos professores do departamento de química, aos funcionários da UFSC e do Programa de Pós-Graduação.

Às agências de fomento, CAPES, CNPq e FAPESC, pelo apoio financeiro que permitiu a realização desta pesquisa. À UFSC e ao INCT-Catálise pela infraestrutura.

É justo que muito custe o que muito vale.

Santa Tereza D'Avila

RESUMO

Na busca por novas tecnologias no universo dos nanomateriais empregados no tratamento de câncer, esta Tese reporta a síntese e caracterização de duas plataformas nanoestruturadas incorporadas com moléculas fotossensíveis, capazes de serem empregadas nas Terapias Fototérmica e Fotodinâmica para o tratamento de câncer de mama e câncer de pele melanoma. Apesar das numerosas vantagens que as fototerapias apresentam no tratamento de câncer, sua aplicação clínica ainda é pouco difundida devido à dificuldade no desenvolvimento de sistemas de liberação capazes de entregar o fotossensibilizador (FS) ao tecido alvo, sem detrimento de suas propriedades fotoquímicas. A primeira estratégia consistiu na aplicação de nanopartículas de ouro (AuNPs) recobertas com uma camada polimérica catiônica de *N*-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC), capazes de incorporar o FS azul de metileno (AM) e viabilizar sua aplicação biológica. O conjugado HTCC-AM-AuNPs, formado a partir de interações eletrostáticas entre seus componentes, apresentou morfologia esférica, tamanho compatível com direcionamento passivo (150 nm) e um potencial Zeta de superfície catiônico (+26 mV), que seria capaz de promover uma maior interação material-células. Ao absorver radiação na região do vermelho (660 nm, 100 mW cm⁻²) o conjugado demonstrou capacidade de produção de EROs, ainda que em menor proporção em relação ao AM livre, dentre elas oxigênio singlete (¹O₂) e radical hidroxila ([•]OH). Além disso, observou-se uma redução da foto-oxidação do AM conjugado, e o efeito foi associado à fotoproteção conferida pela camada polimérica (HTCC) de revestimento. Análises de lentes térmicas revelaram que o conjugado é capaz de converter cerca de 25% da energia absorvida em calor. Os testes biológicos *in vitro* contra células de câncer de mama MDA-MB231, na presença de luz, revelaram maior efeito citotóxico de HTCC-AM-AuNPs em relação ao AM livre, apesar de sua menor capacidade de geração de espécies citotóxicas, o que aponta para um efeito sinérgico (fotodinâmico e fototérmico) proporcionado por TFT e TFD. No escuro, o conjugado proporcionou uma redução significativa da toxicidade do AM. A segunda estratégia proposta nesta Tese consistiu na síntese de um complexo polieletrólítico (CPE) a partir da combinação entre o polícatión BioTMC (*N,N,N*-Trimetil quitosana biotinilada) e o poliânion PAIm-12 (poli ácido acrílico funcionalizado com imidazol), para incorporação do FS Ftalocianina de Zinco II (ZnPc), originando o CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC. Espectros de absorção de luz UV-Vis e de emissão de fluorescência comprovaram a presença de ZnPc na forma monomérica incorporada ao CPE. Além disso, as alterações reportadas nos espectros de FT-IR para a ZnPc conjugada ao CPE são indicativos de uma coordenação axial do Zinco com os grupos carboxilato do PAIm-12. Investigações fotoquímicas empregando ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno)dimalônico (ABDA) e luz vermelha (660 nm, 100 mW cm⁻²) revelaram a capacidade de formação de EROs pela ZnPc em sua forma livre e conjugada, sendo que na forma livre em etanol foram observados modelos cinéticos de fotodegradação de primeira ordem, enquanto que no CPE os modelos observados foram aqueles de duas etapas consecutivas de primeira ordem. Nos testes biológicos *in vitro* contra células de câncer de pele melanoma B16F10, o CPE reduziu a citotoxicidade no escuro da ZnPc, apresentando-se atóxico até a concentração de 2 μM. Na presença de luz branca (55,3 J cm⁻²), o CPE foi capaz de promover a inativação de cerca de 55% das células de melanoma em uma única aplicação. Em suma, os sistemas propostos foram capazes de encapsular os FS, proporcionando fotoproteção e manutenção de suas propriedades físico-químicas e fotodinâmicas, viabilizando estudos futuros para aplicação biológica *in vivo*.

Palavras-chave: terapia fotodinâmica; terapia fototérmica; nanopartículas; fotoquímica; espécies reativas de oxigênio.

ABSTRACT

In the quest for new technologies in the universe of nanomaterials used in cancer treatment, this Thesis reports the synthesis and characterization of two nanostructured platforms incorporated with photosensitive molecules, capable of being used in Photothermal and Photodynamic Therapies for the treatment of breast cancer and melanoma skin cancer. Despite the numerous advantages that phototherapies offer in cancer treatment, their clinical application is still limited due to the challenge in developing delivery systems capable of delivering the photosensitizer (PS) to the target tissue without compromising its photochemical properties. The first strategy involved the application of gold nanoparticles (AuNPs) coated with a cationic polymeric layer of *N*-(2-hydroxy)propyl-3-trimethylammonium chitosan (HTCC), capable of incorporating the PS methylene blue (MB) and then enabling its biological application. The HTCC-MB-AuNPs conjugate, formed from electrostatic interactions between its components, presented a spherical morphology, a size compatible with passive targeting (150 nm), and a cationic surface Zeta potential (+26 mV), which could promote a greater material-cell interaction. Upon absorbing radiation in the red region (660 nm, 100 mW cm⁻²), the conjugate demonstrated the ability to produce ROS, although in a smaller proportion compared to free MB, including singlet oxygen (¹O₂) and hydroxyl radical (•OH). Additionally, a reduction in the photo-oxidation of the MB was observed when conjugated to the system, and this effect was associated with the photoprotection conferred by the polymeric (HTCC) coating layer. Thermal lens analyses revealed that the conjugate is capable of converting about 25% of the absorbed energy into heat. *In vitro* biological tests against MDA-MB231 breast cancer cells, in the presence of light, revealed a higher cytotoxic effect of HTCC-MB-AuNPs compared to free MB, despite its lower capacity to generate cytotoxic species, indicating a synergistic effect (photodynamic and photothermal) provided by PTT and PDT. In the dark, the conjugate significantly reduced the toxicity of MB. The second strategy proposed in this Thesis involved the synthesis of a polyelectrolyte complex (PEC) from the combination of the polycation BioTMC (*N,N,N*-Trimethyl biotinylated chitosan) and the polyanion PAIm-12 (imidazole-functionalized polyacrylic acid), to incorporate the PS Zinc Phthalocyanine II (ZnPc), resulting in the PEC PAIm-12-ZnPc-BioTMC. UV-Vis light absorption spectra and fluorescence emission spectra confirmed the presence of ZnPc in the monomeric form incorporated into the PEC. Moreover, the alterations reported in the FT-IR spectra for ZnPc conjugated to the PEC, indicate an axial coordination of Zinc with the carboxylate groups of the PAIm-12. Photochemical investigations employing 9,10-anthracenediyl-bis(methylene)dimalonic acid (ABDA) and red light (660 nm, 100 mW cm⁻²) revealed the ROS formation capability by ZnPc in its free and conjugated forms, with first-order photodegradation kinetics observed in the free form in ethanol, while in the PEC, the observed models were those of two consecutive first-order steps. *In vitro* biological tests against B16F10 melanoma skin cancer cells showed that the PEC reduced the dark cytotoxicity of ZnPc, presenting non-toxicity up to a concentration of 2 μM. In the presence of white light (55.3 J cm⁻²), the PEC was able to promote the inactivation of about 55% of the melanoma cells in a single application. In summary, the proposed systems were able to encapsulate the PS, providing photoprotection and maintaining their physicochemical and photodynamic properties, enabling future studies for *in vivo* biological applications.

Keywords: Photodynamic; photothermal therapy; nanoparticles; photochemistry; reactive oxygen species.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Diagrama de Jablonski, que mostra uma representação da absorção de fótons e dos possíveis caminhos de desativação do estado excitado.....	17
Figura 2 - Representação dos mecanismos de ação fotodinâmica do tipo I e do tipo II, em que A representa um substrato oxidável.....	18
Figura 3 - Representação dos orbitais moleculares para o oxigênio nos estados tripleto (esquerda) e singlete (direita). A distribuição dos elétrons nos orbitais anti-ligantes (π_x^* e π_y^*), destacados em vermelho, define a multiplicidade da molécula.....	19
Figura 4 - Estrutura geral das ftalocianinas – sem metal coordenado.....	20
Figura 5 - Representação de ressonância plasmônica localizada na superfície de nanopartículas de ouro (AuNPs), a partir da absorção de radiação eletromagnética.	22
Figura 6 - Estágios de formação do câncer de mama e fatores de risco modificáveis e não modificáveis associados.....	24
Figura 7 – Estágios de evolução do câncer de pele melanoma.	26
Figura 8 – Representação do efeito EPR em um tumor, evidenciando a presença de fenestrações nos vasos sanguíneos tumorais, ausentes nos tecidos saudáveis.	29
Figura 9 – Estrutura da (a) quitina e (b) quitosana.....	31
Figura 10 – Estrutura geral da <i>N,N,N</i> -trimetil quitosana (TMC).	34
Figura 11 – Estrutura geral do <i>N</i> -(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio (HTCC).....	35
Figura 12 –Estrutura do FS Azul de Metileno (esquerda); Estrutura do Leuco-AM (direita).	39
Figura 13 – Esquema da síntese do cloreto de <i>N</i> -(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana, a partir da reação entre a quitosana e o cloreto de trimetil glicidil amônio.	49
Figura 14 – Viscosidade reduzida (η_{red} , mL g ⁻¹) em função da concentração de quitosana (g mL ⁻¹) com os dados experimentais listados na Tabela A1 (Apêndice A). O intercepto representa a $[\eta]$, 532,103 mL g ⁻¹ para a quitosana, cujo valor foi utilizado para a obtenção de sua massa molar viscosimétrica <i>MV</i>	61
Figura 15 – Estrutura geral do biopolímero quitosana, cuja cadeia é composta em 26% por monômeros acetilados e o restante, 74%, por monômeros desacetilados.....	62

Figura 16 – Espectros de RMN ^1H 400 MHz da quitosana (a) e do derivado catiônico HTCC (b), em D_2O . Os sinais são destacados e relacionados aos respectivos hidrogênios que puderam ser identificados.	63
Figura 17 – Espectros de infravermelho da quitosana (a) e do derivado catiônico HTCC (b).	66
Figura 18 – Estrutura geral do HTCC, polímero catiônico obtido a partir da reação de quaternização da quitosana, composto em 26% por monômeros acetilados, 5% por desacetilados e 69% por monômeros quaternizados.	66
Figura 19 – Títulações potenciométricas. (a) Quitosana, $1,1 \text{ g L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, V_1 , V_2 e pK_a destacados; (b) HTCC, $2,0 \text{ g L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pK_{a1} e pK_{a2} destacados.	68
Figura 20 – Padrões de difração de raios X da quitosana pura e da quitosana quaternizada (HTCC).	69
Figura 21 – (a) Espectro de UV-Vis das AuNPs ($2,31 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) – inserto: coloração avermelhada da solução aquosa de AuNPs; (b) imagens de MET 100 kV das AuNPs, escala de 100 nm; (c) histograma de distribuição de tamanhos usado para determinar o tamanho médio das AuNPs.	71
Figura 22 – Representação esquemática da síntese do conjugado HTCC-AM-AuNPs.	72
Figura 23 – (a) Espectros de absorção do HTCC-AM-AuNPs, $[\text{AuNPs}] = 3,5 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{MB}] = 7,4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a imagem inserida mostra a coloração do conjugado em solução aquosa. (b) Imagem de MET (escala 100 nm) e (c) Imagem de MEV do HTCC-AM-AuNPs, as setas vermelhas indicam a camada polimérica de HTCC recobrando a partícula...	74
Figura 24 – Espectro de energia dispersiva com os resultados percentuais (%), em massa, dos elementos constituintes da amostra HTCC-AM-AuNPs. Voltagem de aceleração de 15,0 kV, magnificação de 20000.	75
Figura 25 - (a) Espectros de emissão de fluorescência do AM livre em etanol e em água, e do AM conjugado ao HTCC-AM-AuNPs, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 600 nm, fenda 10 nm, $[\text{AM}]$ em etanol = $9,67 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{AM}]$ em água e no HTCC-AM-AuNPs = $5,42 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Comparação entre a absorção visível das AuNPs e a emissão de fluorescência do AM no conjugado HTCC-AM-AuNPs.....	77

Figura 26 – (a) Transientes de LT para a amostra de HTCC-AM-AuNPs em diferentes potências de excitação (20, 30, 38, 49 mW); (b) Parâmetro θ_{th} versus potência de excitação do laser.....	79
Figura 27 – Espectros de absorção UV-Vis do AU ($7,8 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹), sob iluminação ($\lambda_{emi} = 660$ nm, 100 mW cm ⁻²), na presença de AM livre em água(a) e de HTCC-AM-AuNPs (b), [AM] = 2×10^{-6} mol L ⁻¹ , a 25 °C. As setas indicam a redução da absorbância do AU (285 nm) à medida em que o processo de irradiação acontece. As imagens inseridas mostram, em destaque, a variação da absorbância do AU em 285, 332 ou 330 nm, em função do tempo. ..	81
Figura 28 – Espectros de UV-Vis do AU ($7,8 \times 10^{-5}$ mol L ⁻¹) na presença de AuNPs livres, sob irradiação com um (a) laser vermelho ($\lambda_{emi} = 660$ nm) e (b) laser verde ($\lambda_{emi} = 530$ nm). [AuNPs] = 1×10^{-10} mol L ⁻¹	83
Figura 29 – Espectros de RPE obtidos para as soluções contendo (em cima) DMPO + HTCC-AuNPs; (meio) DMPO + AM livre e (embaixo) DMPO + HTCC-AM-AuNPs, após 3 min de iluminação.	85
Figura 30 – Espectro RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha), para a amostra DMPO + AM livre, irradiado por 3 min. Parâmetros de simulação: $aN = 14.9437$ G; $aH = 14.6276$ G.	85
Figura 31 – Células de câncer de mama MDA-MB231 plaqueadas nos poços, após ensaio de citotoxicidade <i>in vitro</i> com HTCC-AM-AuNPs e os grupos controle AM livre, AuNPs livres e HTCC-AuNPs. Em cima: amostras tratadas no escuro; Embaixo: amostras tratadas com luz (30 min, sistema de LED com luz branca, 55,3 J cm ⁻²).....	88
Figura 32 – Ensaio de citotoxicidade celular pelo método colorimétrico de SRB, comparando o efeito dos grupos controle AM livre, AuNPs livres e HTCC-AuNPs e do conjugado HTCC-AM-AuNPs contra células de câncer de mama MDA-MB231, (a) no escuro e (b) com iluminação (30 min, 55,3 J cm ⁻²). Os gráficos mostram a porcentagem de células que sobreviveram ao tratamento, em diferentes concentrações das amostras.....	89
Figura 33 – (a) Estrutura geral das ftalocianinas (esquerda); (b) Estrutura da ftalocianina de zinco.....	92
Figura 34 – Etapas de formação de um CPE.....	94
Figura 35 – Equilíbrios ácido-base e estruturas iônicas do polímero PAIm, de acordo com seus pK_{as}	95
Figura 36 – Estrutura da biotina.....	97

Figura 37 – Rota sintética da TMC considerando os diferentes caminhos reacionais possíveis, uma vez que a reação da quitosana com CH ₃ I pode levar à: mono NHCH ₃ , di N(CH ₃) ₂ e tri ⁺ N(CH ₃) ₃ alquilação do nitrogênio da amina. A última etapa consiste na troca de contra-íon iodeto para cloreto, levando a formação da TMC.	104
Figura 38 – Estrutura molecular do pireno.....	107
Figura 39 – Passo a passo da síntese do CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC. Todo o processo foi realizado em pH 5,5, no escuro.....	109
Figura 40. Reação de oxidação da sonda ABDA com oxigênio singlete (¹ O ₂), levando à formação do endoperóxido (ABDA-O ₂).....	111
Figura 41 – (a) Espectros de absorção de UV-Vis da ZnPc em etanol em diferentes concentrações (de 0 a 4,53×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹); e (b) em água (de 0 a 3,60×10 ⁻⁵ mol L ⁻¹).	114
Figura 42 – Espectros de emissão da ZnPc em água (linha preta) e em etanol (linha vermelha). [ZnPc] = 5×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; λ _{excitação} = 605 nm; fenda 5 nm.	115
Figura 43 – Aspecto visual (a) do produto intermediário iodeto de TMC e (b) do produto cloreto de TMC.	116
Figura 44 – Espectro de RMN de ¹ H da TMC, com destaque no canto superior direito para as proporções entre os monômeros que a compõe, mostrando que a cadeia polimérica é composta por 56% de monômero dimetilado, 18% de monômero quaternizado e pelos 26% de monômero acetilado originários. Os percentuais foram posteriormente confirmados por titulação potenciométrica e análise elementar.	118
Figura 45 – Espectros de infravermelho, em ampliação (de 2000 a 500 cm ⁻¹), da quitosana (a) e da TMC (b).....	119
Figura 46 – Titulação potenciométrica de 11,7 mg de TMC com KOH 0,085 mol L ⁻¹ , com notação do pK _a	121
Figura 47 – Estrutura da TMC.	121
Figura 48 – Esquema de síntese da Bio-TMC, a partir da TMC, empregando biotina e o agente ativadores NHS e EDC. A reação leva à formação de uma nova ligação éster.	122
Figura 49 - Espectros de IV para TMC (preto) e BioTMC (vermelho), em ampliação a região entre 2090-980 cm ⁻¹	123
Figura 50 – Espectros de RMN de ¹ H da (a) TMC e da (b) Bio-TMC, com destaque para a região de 0,9 a 2,2 ppm, onde é observado o aparecimento dos sinais em destaque... 124	124
Figura 51 – Síntese do PAIm-12, a partir do PAIm. O PAIm é obtido a partir da funcionalização do poliácido acrílico com com grupos imidazóis, conferindo uma proporção	

1:1 entre grupos ácido carboxílico e imidazol à estrutura final do PAIm. O PAIm-12, por sua vez, é resultado da alquilação do PAIm, com 1-bromo dodecano.	125
Figura 52 – Espectro de RMN ¹ H 200 MHz do PAIm (ppm): 7.53, 2H (a,b); 8.81, 1H (c); 4.29, 2H (d); 3.34, 2H (e); 3.74, 2H (f); 3.19, 1H (g); 2.13, 2H (h); 2.22, 1H (i).....	126
Figura 53 - Espectro de RMN ¹ H 200 MHz do PAIm-12 (ppm): 7.52, 2H (a,b); 8.76, 1H (c); 4.31, 2H (d); 3.30, 2H (e); 3.70, 2H (f); 3.14, 1H (g); 2.08, 2H (h); 2.20, 1H (i).....	126
Figura 54 - Espectro de infravermelho do PAIm (linha preta) e do PAIm-12 (linha vermelha).	127
Figura 55 – Estrutura polimérica do PAIm-12, composto em 50% de monômeros com grupo carboxilato, 38% de monômeros com grupo imidazol livre e 12% com grupos de imidazol alquilado.	128
Figura 56 – Equilíbrios ácido-base e espécies prevalentes em cada pH, de acordo com os pK _a s obtidos experimentalmente (titulação potenciométrica) para o PAIm-12.....	129
Figura 57 – Plote da razão entre a intensidade de emissão das bandas I e III do pireno em razão da concentração de PAIm-12, em pH 2,5 (a); 5,5 (b) e 9,0 (c). [pireno] = 5×10 ⁻⁷ mol L ⁻¹	131
Figura 58 – Espectro de infravermelho (a) do PAIm-12 em pH 5,5, (b) da ZnPc em pH 5,5 e (c) do PAIm-12 <i>versus</i> PAIm-12-ZnPc em pH 5,5.	134
Figura 59 – Espectros de infravermelho (a) da BioTMC e (b) comparação entre PAIm-12-ZnPc e PAIm-12-ZnPc-BioTMC.	136
Figura 60 – Perfil de absorção de luz UV-Vis do conjugado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, em pH 5,5. [ZnPc] = 5×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; [PAIm-12] = 2,87×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; [BioTMC] = 0,55 g L ⁻¹	137
Figura 61 – Histograma de distribuição de tamanhos para o conjugado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, obtido a partir da média aritmética de medidas realizadas em triplicata. [ZnPc] = 5×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; [PAIm-12] = 2,87×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; [BioTMC] = 0,55 g L ⁻¹	138
Figura 62 – Resultado para uma das medidas de potencial Zeta da amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC. [ZnPc] = 5×10 ⁻⁶ mol L ⁻¹ ; [PAIm-12] = 2,87×10 ⁻⁴ mol L ⁻¹ ; [BioTMC] = 0,55 g L ⁻¹	138
Figura 63 – (a) Espectro de excitação do conjugado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, em pH 5,5, fenda 5 nm. (b) Espectro de emissão de fluorescência do conjugado, em pH 5,5. λ de	

excitação em 605 nm, fenda em 5 nm. $[ZnPc] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[PAIm-12] = 2,87 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[BioTMC] = 0,55 \text{ g L}^{-1}$ 139

Figura 64 – Espectros obtidos para os cálculos de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F). (a) Espectros de absorção UV-Vis da ZnPc livre em etanol (linha preta), ZnPc livre em água (linha vermelha) e ZnPc conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC (linha azul). As leituras de absorvância para o cálculo de ϕ_F foram realizadas em 605 nm, correspondente ao comprimento de onda empregado na excitação. (b) Perfil de emissão da ZnPc em etanol. (c) Perfil de emissão da ZnPc em água. (d) Perfil de emissão da ZnPc no conjugado. $[ZnPc] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 141

Figura 65 – Cinéticas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo, em nanosegundos, empregando LED de 370 nm, filtro 380 nm, para determinação do τ da ZnPc livre em etanol e ZnPc conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC. 142

Figura 66 – Perfis de emissão de fluorescência da ZnPc conjugada ao CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC, com adições de alíquotas de uma solução aquosa de KI 3 mol L^{-1} 143

Figura 67 – Perfis UV-Vis de foto-oxidação de ABDA na presença de ZnPc livre em etanol (a) e de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (b), empregando laser vermelho (660 nm , 100 mW cm^{-2}). Cinéticas de foto-oxidação de ABDA e ZnPc para ZnPc livre em etanol (c) e PAIm-12-ZnPc-BioTMC (d). $[ABDA] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[ZnPc] = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 144

Figura 68 – Cinéticas de foto-oxidação da ZnPc, obtidas no experimento de geração de EROs empregando a sonda ABDA, para a amostra de ZnPc livre em etanol (a) e PAIm-12-ZnPc-BioTMC (b). 145

Figura 69 - Perfil UV-Vis de foto-oxidação de ABDA (398 nm) na presença de ZnPc livre em etanol (a) e de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (b), empregando azida de sódio como agente supressor de 1O_2 , com fonte de iluminação de laser vermelho (660 nm , 100 mW cm^{-2}); (c) Cinética ABDA (398 nm) para ZnPc livre; (d) Cinética ABDA (404 nm) para ZnPc conjugada ao CPE; (e) Cinética de fotobranqueamento em 667 nm para ZnPc livre; (f) Cinética de fotobranqueamento em 674 nm para ZnPc conjugada. $[ABDA] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[azida] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[ZnPc] = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ 146

Figura 70 – Espectros de absorção UV-Vis de foto-oxidação de ABDA (398 nm) na presença de ZnPc livre em etanol (a) e de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (b), empregando DMSO como agente supressor de $\bullet OH$, com fonte de iluminação de laser vermelho (660 nm , 100 mW cm^{-2}); (c) Cinética ABDA (398 nm) para ZnPc livre; (d) Cinética ABDA (404 nm) para ZnPc

conjugada ao CPE; (e) Cinética de fotobranqueamento em 667 nm para ZnPc livre; (f) Cinética de fotobranqueamento em 674 nm para ZnPc conjugada. [ABDA] = 1×10^{-5} mol L ⁻¹ ; 10% DMSO; [ZnPc] = $4,5 \times 10^{-6}$ mol L ⁻¹	149
Figura 71 – (a) Perfil de absorção UV-Vis representativo dos 480 min de iluminação da amostra de ZnPc livre em água, empregando laser vermelho (660nm, 100 mW cm ⁻²); (b) Cinética de fotobranqueamento de ZnPc livre em água em 610 e 667 nm. [ZnPc] = $2,15 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	151
Figura 72 - (a) Espectros de absorção UV-Vis representativo dos 480 min de iluminação da amostra de ZnPc livre em etanol, empregando laser vermelho (660nm, 100 mW cm ⁻²); (b) Cinética de fotobranqueamento de ZnPc livre em etanol em 667 nm. [ZnPc] = $2,15 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	153
Figura 73 - (a) Perfil de absorção UV-Vis representativo dos 60 min de iluminação da amostra de ZnPc conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC, empregando laser vermelho (660nm, 100 mW cm ⁻²); (b) Cinética de fotobranqueamento de ZnPc em 674 nm. [ZnPc] = $2,15 \times 10^{-7}$ mol L ⁻¹	154
Figura 74 – Densidade celular (%) de células de melanoma B16F10 na ausência (grupo controle) e na presença de diferentes concentrações (0,25-5 µM) de ZnPc livre em água (coluna azul), de PAIm-12-BioTMC (coluna preta) e de CPE (coluna vermelha), (a) no escuro e (b) na presença de luz branca (30 min, 55,3 J cm ⁻²).	155

LISTA DE FIGURAS – APÊNDICES

Figura B 1 – Espectro de infravermelho da quitosana (400-4000 cm ⁻¹) empregado na caracterização e no cálculo do GD _{FT-IR} . As bandas destacadas em 3300 e 1420 cm ⁻¹ são representativas dos monômeros desacetilados da quitosana, ao passo que a banda em 1320 cm ⁻¹ representa o monômero acetilado.....	175
Figura B 2 – Destaque do infravermelho da quitosana plotado em absorbância, na região de interesse dos picos em 1324 cm ⁻¹ e 1424 cm ⁻¹ e suas respectivas áreas, utilizadas para calcular o GD _{FT-IR} pela Equação 7.....	176
Figura B 3. Espectros de absorção infravermelho da quitosana e da TMC, em ampliação.....	176

Figura C 1 – (a) Espectro de absorção UV-Vis e (b) Curva de calibração para determinação de ϵ de AuNPs em água, 25 °C.....177

Figura D 1 – (a) Espectros de absorção UV-Vis do HTCC-AM-AuNPs em água, as concentrações do conjugado variam de 0 a $3,9 \times 10^{-11}$ mol L⁻¹. (b) Regressão linear para determinação do $\epsilon_{\text{HTCC-AM-AuNPs}}$, em água, 25 °C.....178

Figura E 1 – (a) Perfis de absorção UV-Vis da ZnPc em etanol, em diferentes concentrações (0 a $4,53 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹). Os comprimentos de onda de máxima absorção de luz, bem como as bancas às quais correspondem estão destacados. (b) Regressão linear para a determinação do $\epsilon_{\text{ZnPc,etanol}}$ em 664 nm. (c) Regressão linear para a determinação do $\epsilon_{\text{ZnPc,etanol}}$ em 605 nm..... 179

Figura E 2 – (a) Perfis de absorção UV-Vis da ZnPc em água, em diferentes concentrações (0 a $3,60 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹). O comprimento de onda de máxima absorção de luz ocorre em 615 nm. (b) Regressão linear para a determinação do $\epsilon_{\text{ZnPc,água}}$ em 615 nm. 180

Figura F 1 – Curvas de titulação potenciométrica para o PAIm (a) e para o PAIm-12 (b). O número de mols de polímero titulado foi de 1×10^{-4} mol, equivalente a 28 mg para o PAIm e 45 mg para o PAIm-12. Solução titulante empregada - KOH 0,085 mol L⁻¹, 25 °C..... 181

Figura G 1 – Perfis de emissão de fluorescência de pireno em titulação com PAIm-12 em (a) pH 2,5; (b) pH 5,5 (Tampão Bis-Tris 0,1 mol L⁻¹) e (c) pH 9,0 (Tampão Tris 0,1 mol L⁻¹). [pireno] = 5×10^{-7} mol L⁻¹..... 182

LISTA DE FIGURAS – ANEXOS

Figura AA 1 – (a) Irradiância espectral do sistema de LED *in vitro*, modelo K1490_M006, luz branca. (b) Curva de calibração de irradiância *versus* porcentagem de PWM. 184

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Metodologias aplicadas no Parte I.	42
Fluxograma 2 – Metodologias aplicadas no Parte II.	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação entre os percentuais de C, H e N presentes nas amostras de (a) quitosana e (b) HTCC, calculados teoricamente e determinados experimentalmente através de análise elementar.	64
Tabela 2 – Resultados, em percentual de massa e átomos, com erro relativo, dos elementos constituintes da amostra HTCC-AM-AuNPs, obtidos através de análise de energia dispersiva de elétrons.....	75
Tabela 3 – Deslocamentos de Stokes ($\Delta\nu$, cm^{-1}) para o AM livre em etanol e em água e para o AM conjugado ao HTCC-AM-AuNPs.	76
Tabela 4 – Constantes de velocidade k para a degradação do AU (k_1 e k_2) e constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}), em solução aquosa a 25 °C. As medidas foram realizadas na ausência e na presença de supressores.	82
Tabela 5 - Comparação entre os percentuais de C, H e N presentes nas amostras de (a) quitosana e (b) TMC, calculados teoricamente e determinados experimentalmente através de análise elementar.	119
Tabela 6 - ϕ_F e τ determinados experimentalmente para a ZnPc em diferentes microambientes.....	141
Tabela 7 – Constantes de velocidade (k) para a degradação da ABDA (k_1 e k_2) e constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}), para ZnPc livre em etanol e para PAIm-12-ZnPc-BioTMC em água, a 25 °C. As medidas foram realizadas na ausência e na presença de supressores.	147
Tabela 8 – Constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (ϕ_{FB}) para ZnPc livre e conjugada.	154

LISTA DE TABELAS - APÊNDICE

Tabela A 1 – Dados experimentais obtidos no experimento de viscosidade intrínseca da quitosana em uma solução aquosa contendo ácido acético 0,3 mol L ⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol L ⁻¹	174
---	-----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Absorbância
ABDA	Ácido 9,10-antracenediil-bis(metileno)dimalônico
AM	Azul de metileno
AU	Ácido úrico
AuNPs	Nanopartículas de ouro
B16F10	Linhagem celular cuja morfologia é semelhante à das células epiteliais, isolada de tecido de camundongo com melanoma
Bio	Biotina
BioTMC	<i>N,N,N</i> -Trimetil quitosana, funcionalizada com biotina
cac	Concentração agregacional crítica
CAS	Chemical Abstracts Service – Registro único de produtos químicos
CI	Conversão interna
CIS	Cruzamento intersistema
CPE	Complexo polieletrólítico
DMPO	5,5-dimetil-1-pirrolina-N- óxido
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDC	<i>N</i> -(3-dimetilaminopropil)- <i>N'</i> -etilcarbodiimida
EPR	Efeito de retenção e permeabilidade aumentada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
F	Área sob o espectro de emissão
FB	Fotobranqueamento
FS	Fotossensibilizador
FT-IR	Infravermelho com transformada de Fourier
GD	Grau de desacetilação
GD_{FT-IR}	Grau de desacetilação determinado por infravermelho com transformada de Fourier
GDM	Grau de dimetilação
GD_{médio}	Grau de desacetilação médio
GD_{RMN}	Grau de desacetilação determinado por RMN de ¹ H

GD_{TP}	Grau de desacetilação determinado por titulação potenciométrica
GPM₃	Grupo de Pesquisa em Materiais Moleculares e Mesomórficos
GQ	Grau de quaternização
GS	Grau de substituição
GS_{HTCC}	Grau de substituição obtido no derivado HTCC
HP-55	Ftalato de hidroxipropilmetilcelulose
HTCC	Cloreto de N-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana
INCT	Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
<i>k</i>	Constante de velocidade
<i>k_{FB}</i>	Constante de velocidade de fotobranqueamento
LaCFI	Laboratório de Catálise e Fenômenos Interficiais
LCME	Laboratório Central de Microscopia Eletrônica
Leuco-AM	Leuco Azul de Metileno
LSP	Plasmon de Superfície Localizado
LT	Lente térmica
MDA-MB231	Linhagem de adenocarcinoma mamário
MDR	Resistência a múltiplas drogas (<i>Multidrug resistance</i>)
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MM	Massa molar
MWCO	Molar weight cut-off – massa molecular de corte
N_A	Constante de Avogadro
NaCt	Citrato de sódio tribásico
NaN₃	Azida de sódio
NHS	N-Hidroxisuccinimida
NPs	Nanopartículas
OM	Orbital molecular
PAA	Poli(ácido acrílico)
PAIm	Poli(ácido acrílico) funcionalizado com grupos imidazóis
PAIm-12	Poli(ácido acrílico) funcionalizado com grupos imidazóis, alquilado com 1-bromo dodecano

PAIm-12-ZnPc	Complexo formado entre o polímero PAIm-12 com o fotossensibilizador ZnPc
PAIm-12-ZnPc-BioTMC	Complexo formado entre o polímero PAIm-12 com o fotossensibilizador ZnPc, junto ao polímero BioTMC
pK_a	Constante de dissociação ácida
PLGA	Poli(ácido lático-co-ácido glicólico)
Polimat	Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos
RMN de ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RPE	Ressonância Paramagnética Eletrônica
S₀	Estado fundamental
S₁	Estado excitado singleto de menor energia
SRB	Sulforodamina B
T₁	Estado excitado tripleto de menor energia
TFD	Terapia Fotodinâmica
TFT	Terapia Fototérmica
TMC	Cloreto de <i>N,N,N</i> -trimetil quitosana
UEM	Universidade Estadual de Maringá
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
ZnPc	Ftalocianina de Zinco

Observação: algumas siglas foram utilizadas em inglês por não haver correspondente abreviatura em português, na literatura.

LISTA DE SÍMBOLOS

δ	Deslocamento químico (ppm)
η	Viscosidade absoluta
ζ	Potencial Zeta (mV)
λ	Comprimento de onda (nm)
ϵ	Coefficiente de absorção molar ($L \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)
τ	Tempo de vida de emissão de fluorescência
$\Delta\nu$	Deslocamento de Stokes
λ_{abs}	Comprimento de onda máximo de absorção (nm)
λ_{emi}	Comprimento de onda máximo de emissão (nm)
η_{esp}	Viscosidade específica
λ_{exc}	Comprimento de onda de excitação (nm)
ϕ_{F}	Rendimento quântico de emissão de fluorescência
$\bullet\text{OH}$	Radical hidroxia
ϕ_{R}	Rendimento quântico de fluorescência de referência
η_{red}	Viscosidade reduzida
η_{rel}	Viscosidade relativa
\bar{M}_V	Massa molar viscosimétrica média
$[\eta]$	Viscosidade intrínseca
${}^0\text{FS}$	Fotossensibilizador no estado fundamental singleto
${}^1\text{A}$	Representa um substrato oxidável
${}^1\text{FS}^*$	FS no estado excitado singleto
${}^1\text{O}_2$	Oxigênio singleto
${}^3\text{FS}^*$	FS no estado excitado tripleto
${}^3\text{O}_2$	Oxigênio tripleto

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	16
	FOTOTERAPIAS: CONTEXTUALIZANDO A TERAPIA FOTODINÂMICA E A TERAPIA FOTOTÉRMICA.....	16
	1.1.1 O câncer.....	23
1	<i>1.1.1.1 O câncer de mama.....</i>	<i>23</i>
1.1	<i>1.1.1.2 O melanoma.....</i>	<i>25</i>
	1.1.2 Fotossensibilizadores e sistemas de entrega de fármacos	27
	QUITOSANA.....	31
	1.2.1 N,N,N-Trimetil quitosana (TMC)	33
1.2	1.2.2 N-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC).....	35
	PARTE I.....	36
2	PLATAFORMA BASEADA EM NANOPARTÍCULAS DE OURO FUNCIONALIZADAS COM AZUL DE METILENO, RECOBERTAS COM N-(2-HIDROXI)PROPIL-3-TRIMETILAMÔNIO QUITOSANA: SÍNTESE, CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA <i>IN VITRO</i>.	37
2.1	INTRODUÇÃO.....	38
2.2	OBJETIVOS.....	41
2.3	PARTE EXPERIMENTAL.....	42
2.4	MATERIAIS	43
2.5	INSTRUMENTAÇÃO	43
2.6	METODOLOGIA.....	44
	2.6.1 Caracterização do material de partida – Quitosana	44
	<i>2.6.1.1 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana (MV).....</i>	<i>45</i>
	<i>2.6.1.2 Caracterização físico-química e determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana</i>	<i>46</i>
	2.6.2 Síntese, caracterização e determinação do grau de substituição (GS) do derivado catiônico cloreto de N-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC).....	48
	2.6.3 Síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato (AuNPs).....	50
	2.6.4 Preparo do conjugado HTCC-AM-AuNPs	50
	2.6.5 Caracterizações físico-químicas das AuNPs, do conjugado HTCC-AM-AuNPs e dos controles AM-AuNPs, HTCC-AuNPs e AM livre.....	51

	2.6.5.1	Determinação do coeficiente de absorção molar das AuNPs (ϵ_{AuNPs})	51
	2.6.5.2	Determinação do coeficiente de absorção molar do conjugado HTCC-AM-AuNPs ($\epsilon_{HTCC-AM-AuNPs}$).....	52
	2.6.5.3	Medidas de espectrofotometria de absorção molecular.....	52
	2.6.5.4	Medidas de tamanho hidrodinâmico e de potencial Zeta.....	52
	2.6.5.5	Morfologia e tamanho por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	53
	2.6.5.6	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Pistola de Emissão de Campo.....	53
	2.6.5.7	Espectros de emissão de fluorescência	54
	2.6.6	Rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F).....	54
	2.6.7	Análise de lentes térmicas (LT)	55
	2.6.8	Ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)	56
	2.6.9	Investigação de produção de EROs e 1O_2.....	57
	2.6.10	Testes biológicos <i>in vitro</i>.....	58
	2.6.10.1	Ensaio colorimétrico de Sulforodamina B.....	58
		RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
2.7	2.7.1	Caracterização da quitosana e do derivado catiônico cloreto de n-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC).....	60
	2.7.2	Caracterização das AuNPs e do conjugado HTCC-AM-AuNPs.....	69
	2.7.3	Análise de lente térmica (LT)	78
	2.7.4	Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete (1O_2)....	80
2.8	2.7.5	Testes biológicos: avaliação de terapia fototérmica e fotodinâmica <i>in vitro</i>	86
3		CONCLUSÕES PARCIAIS.....	90
		PARTE II.....	91
3.1		COMPLEXO POLIELETROLÍTICO CARREGADO COM FTALOCIANINA DE	
3.2		ZINCO (II) DIRECIONADO COM BIOTINA COMO ALTERNATIVA PARA	
3.3		TERAPIA FOTODINÂMICA	91
3.4		INTRODUÇÃO.....	92
3.5		OBJETIVOS	98
3.6		PARTE EXPERIMENTAL.....	100
		MATERIAIS	101
		INSTRUMENTAÇÃO	101
		METODOLOGIA.....	102

	3.6.1	Caracterização do FS Ftalocianina de Zinco (ZnPc)	102
	3.6.2	Caracterização da quitosana	102
	3.6.3	Síntese do cloreto de <i>N.N.N</i>-trimetil quitosana (TMC).....	102
	<i>3.6.3.1</i>	<i>Caracterização físico-química da TMC e determinação de seu grau de quaternização (GQ) 104</i>	
	3.6.4	Síntese da Bio-TMC.....	105
	3.6.5	Síntese do PAIm-12	106
	3.6.6	Caracterização dos polímeros: TMC, Bio-TMC, PAIm e PAIm-12.....	106
	3.6.7	Medidas de concentração agregacional crítica (cac) e micropolaridade local do PAIm-12	107
	3.6.8	Preparo do complexo polieletrólítico (CPE) carregado com ftalocianina de zinco (ZnPc): PAIm-12-ZnPc-BioTMC.....	108
	3.6.9	Caracterização físico-química do CPE	109
	3.6.10	Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs).....	110
	3.6.11	Cinéticas de fotobranqueamento (FB) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (ϕ_{FB})	112
	3.6.12	Testes biológicos: avaliação de TFD <i>in vitro</i>	113
<i>3.7</i>	<i>3.6.12.1</i>	<i>Ensaio colorimétrico de Sulforodamina B.....</i>	<i>113</i>
		RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	114
	3.7.1	Caracterização físico-química do FS Ftalocianina de Zinco (ZnPc)	114
	3.7.2	Síntese e Caracterização do cloreto de <i>N,N,N</i>-Trimetil quitosana (TMC).....	116
	3.7.3	Caracterização da TMC funcionalizada com biotina (Bio-TMC)	122
	3.7.4	Caracterização do PAIm-12	125
	3.7.5	Determinação da concentração agregacional crítica (cac) do PAIM-12	130
	3.7.6	Obtenção e caracterização do complexo polieletrólítico carregado com ZnPc: PAIm-12-ZnPc-BioTMC.....	132
<i>3.8</i>	3.7.7	Investigação da geração de EROS e 1O_2 por ZnPc livre e PAIm-12-ZnPc-BioTMC	143
4	3.7.8	Fotoestabilidade	150
	3.7.9	Testes biológicos <i>in vitro</i> contra melanoma B16F10.....	155
	<i>3.7.9.1</i>	<i>Ensaio colorimétrico de Sulforodamina B</i>	<i>155</i>
		CONCLUSÕES PARCIAIS.....	157
		CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS	159

REFERÊNCIAS	160
APÊNDICE A – DADOS EXPERIMENTAIS DE VISCOSIDADE DA QUITOSANA	174
APÊNDICE B – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA QUITOSANA	175
APÊNDICE C – COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR DAS AUNPS	177
APÊNDICE D – COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR DO CONJUGADO HTCC-AM-AUNPS	178
APÊNDICE E – COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR DA ZNPC EM ETANOL E EM ÁGUA	179
APÊNDICE F – CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA PARA PAIM E PAIM-12	181
APÊNDICE G - PERFIS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PAIM-12	182
ANEXO A – CARACTERÍSTICAS DA FONTE DE EMISSÃO DE LUZ BRANCA “QUENTE” – SISTEMA LED <i>IN VITRO</i> K1490_M006.....	184

INTRODUÇÃO

FOTOTERAPIAS: CONTEXTUALIZANDO A TERAPIA FOTODINÂMICA E A TERAPIA FOTOTÉRMICA

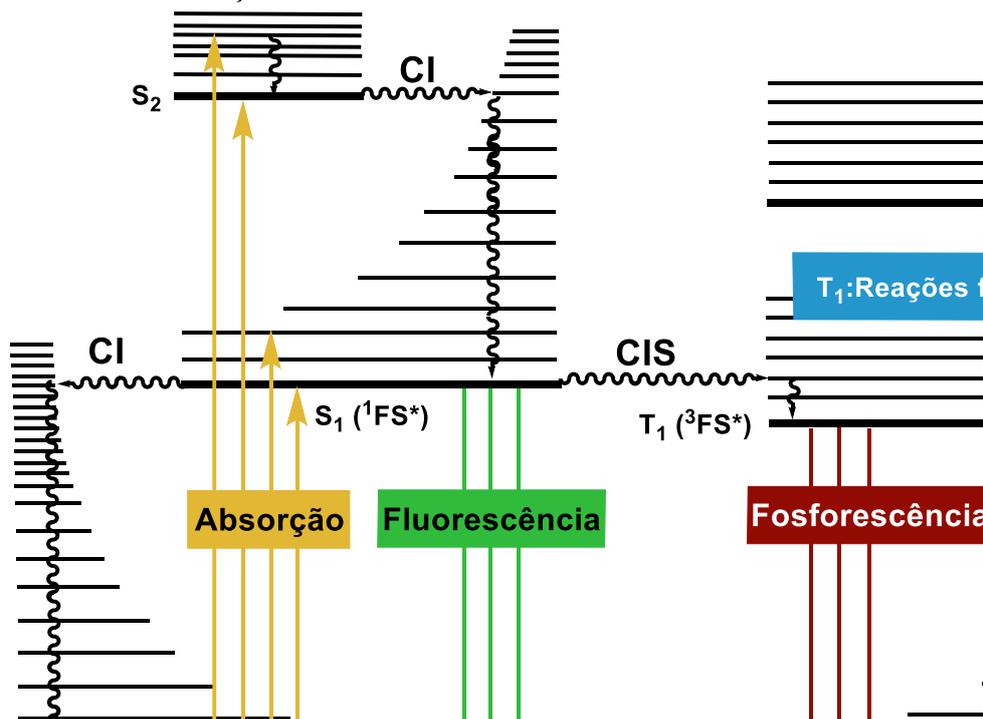
1

1.1 As fototerapias podem ser definidas como estratégias terapêuticas que empregam a luz como principal gatilho para seu funcionamento. O emprego da luz como ferramenta para o tratamento de doenças apresenta registros com mais de três mil anos de antiguidade, advindos das civilizações grega, egípcia, chinesa, romana e indiana, tendo sido direcionado inicialmente às enfermidades que acometiam a pele.[1],[2] Com o passar dos anos e o desenvolvimento das ciências e tecnologia, as fototerapias começaram a ser estudadas para o tratamento de doenças endógenas, com ênfase para o câncer.[3] Dentre as fototerapias conhecidas, destacam-se aquelas que aplicam espécies fotoativadas, que, a partir da absorção da luz, são capazes de produzir o efeito terapêutico almejado, como é o caso da Terapia Fotodinâmica (TFD) e da Terapia Fototérmica (TFT).

A TFD é um procedimento terapêutico clinicamente aprovado e minimamente invasivo, que pode induzir citotoxicidade seletiva em células malignas. Ela parte do princípio da interação de três componentes-chave: uma fonte de luz de comprimento de onda adequado, um fotossensibilizador (FS, composto químico ativável pela luz) e oxigênio.[4] Separados, estes componentes não são nocivos, porém, juntos, iniciam reações fotoquímicas que culminam na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), que mediam reações foto-oxidativas com componentes celulares (DNA, lipídios e proteínas), levando a danos na estrutura celular.[6],[7],[8] Ao absorver luz durante a TFD, o FS é promovido para o estado eletrônico excitado singlete ($S_1, S_2 \dots S_n$) ($^1FS^*$), podendo percorrer diferentes caminhos para perder energia e retornar ao estado fundamental (S_0). Assim, como mostra o diagrama de Jablonski da Figura 1, a transição de $S_1 \rightarrow S_0$ pode ocorrer através da fluorescência, que é um processo radiativo de emissão de fótons (permitido por spin), que ocorre em cerca de 10^{-10} a 10^{-7} s; e/ou da conversão interna (CI), processo não-radiativo que envolve perda de energia na forma de calor e ocorre de forma mais rápida, com duração de 10^{-12} a 10^{-10} s. Ao invés de retornar a S_0 , o $^1FS^*$ também pode passar por uma conversão intersistema (CIS), que é uma transição não radiativa para o estado eletrônico excitado tripleto T_1 ($^3FS^*$), que ocorre em torno de 10^{-9} a 10^{-7} s.[8], [9], [10] Como a CIS envolve transição entre estados de diferente multiplicidade ($S_1 \rightarrow T_1$), ela é um

processo proibido por spin – mas que ocorre, na prática, devido ao acoplamento spin-órbita –, que aumenta o tempo de vida do $^3\text{FS}^*$, possibilitando sua interação com substratos biológicos antes que o FS decaia a S_0 , em um processo conhecido como fosforescência que ocorre em um tempo substancialmente maior.

Figura 1 - Diagrama de Jablonski, que mostra uma representação da absorção de fótons e dos possíveis caminhos de desativação do estado excitado.



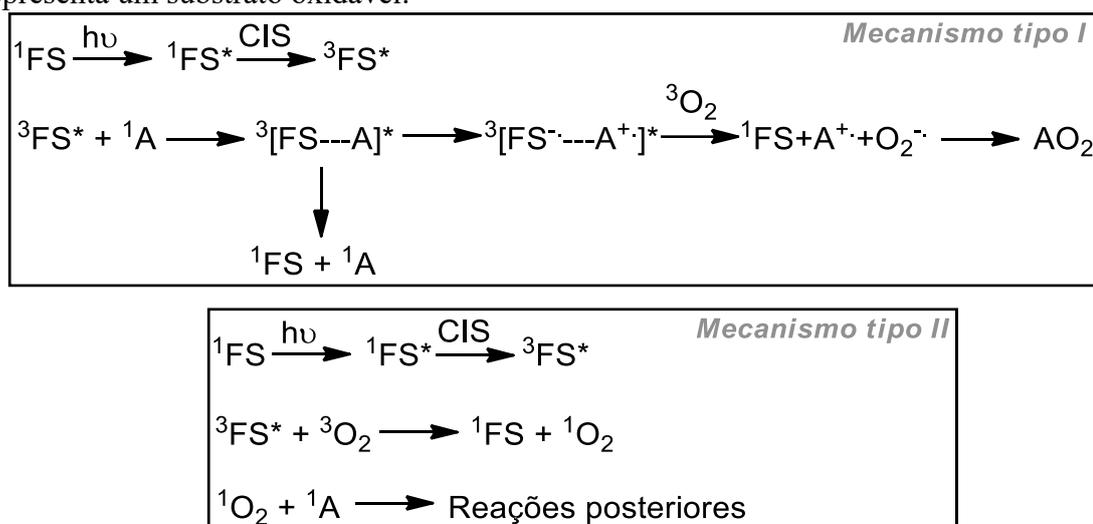
Fonte: adaptado pela autora.[8]

Em geral, as oxidações fotossensibilizadas acontecem no estado tripleto do FS, via dois mecanismos principais, tipo I e tipo II (Figura 2):[5], [11], [12]

- Mecanismo tipo I: a foto-oxidação ocorre pela transferência de elétron entre $^3\text{FS}^*$ e componentes do sistema (^1A), levando a formação de íons radicais que podem reagir com o oxigênio no estado fundamental ($^3\text{O}_2$), resultando em EROs como radical hidroxila ($^{\bullet}\text{OH}$), radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e radical alcóxi (RO^{\bullet}), citotóxicas;
- Mecanismo tipo II: ocorre uma transferência de energia do $^3\text{FS}^*$ para o oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), processo que resulta na geração de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), espécie altamente reativa, que provoca a citotoxicidade.[13], [14]

Os mecanismos fotoquímicos do tipo I e tipo II ocorrem de forma simultânea, e a proporção entre eles é determinada por diversos fatores, tais como, o tipo de FS empregado, a concentração de oxigênio e de substrato, assim como a afinidade de ligação entre o substrato e o FS. Acredita-se que a maioria dos FS opera em maior proporção pelo mecanismo tipo II, ou seja, formando $^1\text{O}_2$. [5]

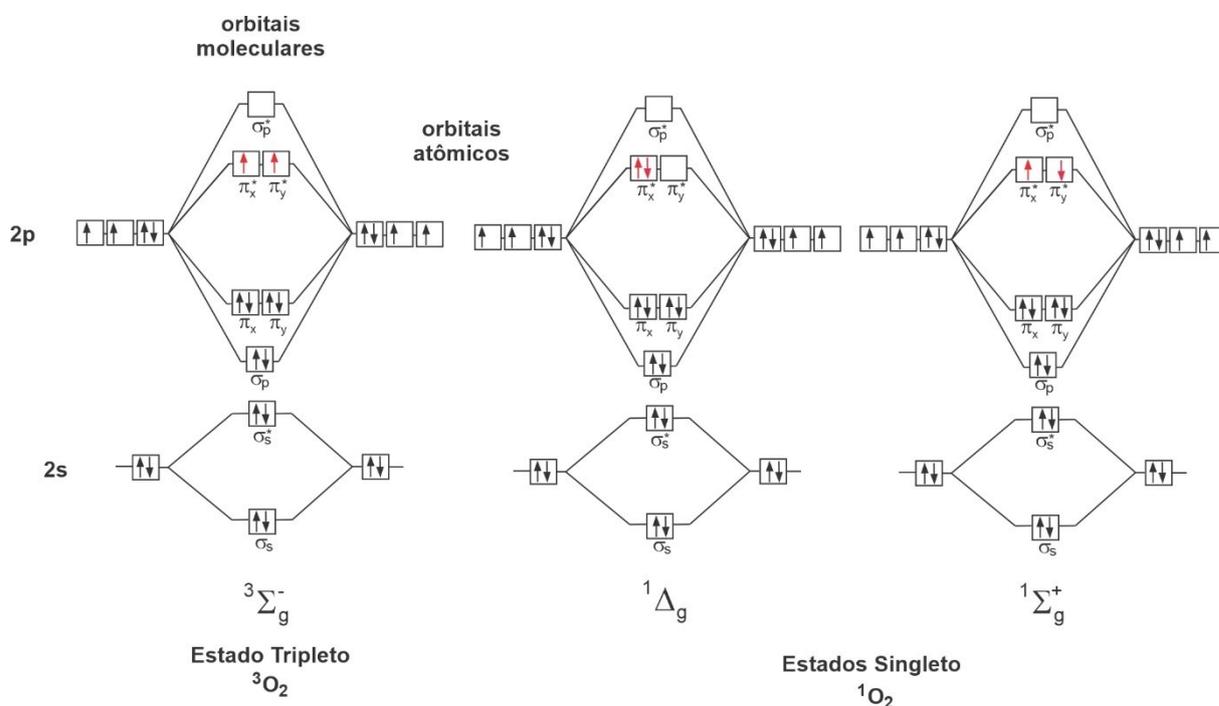
Figura 2 - Representação dos mecanismos de ação fotodinâmica do tipo I e do tipo II, em que A representa um substrato oxidável.



Os mecanismos destacados na Figura 2 evidenciam a importância do oxigênio na TFD. Uma série de estudos já revelou que a maioria dos FS é ineficaz em hipóxia (condição na qual a concentração de O_2 é extremamente baixa). [15], [16] Além disso, os mecanismos só são possíveis devido ao fato peculiar de que o oxigênio molecular, no estado fundamental, encontra-se em configuração tripleto, assim como mostra o orbital molecular (OM) da Figura 3, havendo compatibilidade de spin com o ^3FS . Em seu estado fundamental, os orbitais ocupados de maior energia são um par de orbitais antiligantes duplamente degenerados, que possuem dois elétrons desemparelhados em cada um deles. Os elétrons em questão são spin-paralelos, levando a um spin (S) total igual a 1, que é conhecido como configuração tripleto. De acordo com a regra de Hund, o oxigênio é mais estável na configuração tripleto do que singleto, uma vez que, nesta última, a distribuição dos elétrons nos orbitais antiligantes é energeticamente desfavorável (vide OM do $^1\text{O}_2$, Figura 3). [17], [18], [19] Outro ponto que não pode deixar de ser mencionado é o curto tempo de vida (τ) do $^1\text{O}_2$, que, uma vez produzido em ambiente fisiológico, apresenta τ

inferior a $0,04 \mu\text{s}$ e raio de difusão de apenas $0,02 \mu\text{m}$. [20] Desta forma, para alcançar o efeito citotóxico fotoinduzido durante a TFD, é necessário que o $^1\text{O}_2$ e/ou as EROs sejam produzidos no sítio em que se deseja produzir a foto-oxidação, isto é, nas células cancerosas. Nesta direção, nos últimos anos as pesquisas em TFD têm dedicado esforços para o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos (como FS, por exemplo), planejados para não somente encapsular FS, mas também direcioná-los aos tecidos alvo e, assim, elevar o potencial do tratamento. [21], [22]

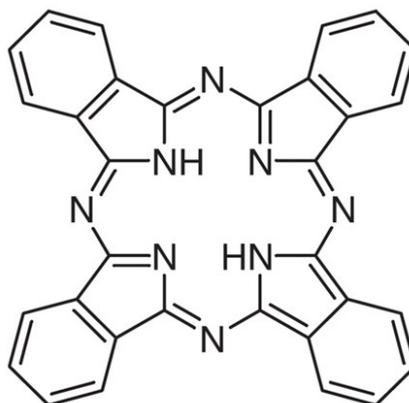
Figura 3 - Representação dos orbitais moleculares para o oxigênio nos estados tripleto (esquerda) e singleto (direita). A distribuição dos elétrons nos orbitais anti-ligantes (π_x^* e π_y^*), destacados em vermelho, define a multiplicidade da molécula.



Assim como o oxigênio, a fonte de luz é componente essencial para a realização da TFD. A escolha da fonte e de seu comprimento de onda de emissão são fatores determinantes para que o efeito fototerapêutico seja obtido, principalmente quando se fala de tumores não superficiais, em que a profundidade de penetração da luz é um fator a ser levado em conta. Desta forma, ao escolher um FS, é necessário que se leve em consideração a faixa de comprimento de onda do espectro eletromagnético em que a molécula absorve luz, considerando que o intervalo ideal se encontra entre 600 a 900 nm, região conhecida como

janela fototerapêutica. No intervalo de comprimentos de onda mencionado, a radiação visível é absorvida em menor proporção pelos componentes constituintes dos tecidos do corpo humano (como melanina e hemoglobina, por exemplo), o que reduz a absorção competitiva da luz e proporciona um maior aproveitamento da mesma pelo FS.[23], [24] Um bom exemplo de FS que se encaixa nesse requisito vem da família das ftalocianinas (Figura 4), que possuem intensa absorção de luz na região do vermelho (de 600 a 700 nm). Experimentos *in vivo* já comprovaram que a profundidade de penetração da luz nesta faixa de comprimento de onda é capaz de atingir 1 cm de profundidade nos tecidos com bom aproveitamento de fótons, podendo atingir camadas mais profundas. Os lasers que emitem luz vermelha têm mostrado resultados promissores na eliminação de tumores com TFD.[25], [26]

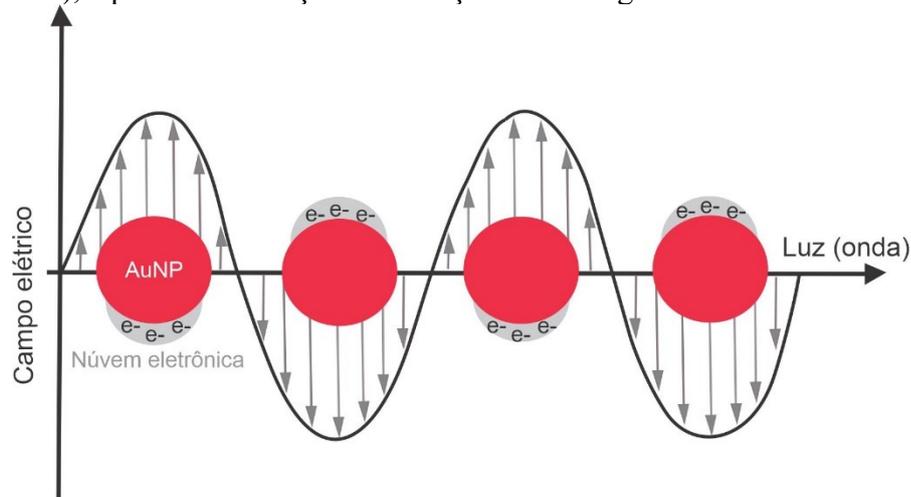
Figura 4 - Estrutura geral das ftalocianinas – sem metal coordenado.



Assim como a TFD, a TFT tem sido estudada como estratégia para o tratamento de diversos tipos de câncer[27], bem como para a inativação de bactérias[28]. Durante a TFT, um FS é empregado com o objetivo de converter a energia dos fótons absorvidos em calor, provocando hipertermia local. A hipertermia consiste na elevação de temperatura do tecido, que pode ocasionar uma série de fenômenos agressivos à célula, como, por exemplo, a desnaturação de proteínas e a evaporação do citosol, processos que levam à morte celular. Ao contrário da TFD, a TFT não depende da presença de oxigênio para gerar seu efeito citotóxico, sendo essa sua principal vantagem.[29], [30] As nanopartículas (NPs) metálicas são um excelente exemplo de material que pode ser empregado como FS em TFT, uma vez que ao absorverem a luz, um dos caminhos possíveis para relaxamento ocorre por meio de um mecanismo não radiativo que resultará na geração de energia térmica.[31] Para entender melhor esta propriedade, é preciso

relembrar que as propriedades físico-químicas dos metais dependem diretamente da mobilidade de seus elétrons. Quando as dimensões de um material metálico são muito menores do que o comprimento de onda da luz que incide sobre ele (partículas de 1 a 100 nm), ocorrem restrições espaciais que reduzem a mobilidade eletrônica e, por sua vez, dão origem a propriedades diferentes daquelas do material de origem. As NPs metálicas plasmônicas, como as de ouro, prata e platina, são especialmente importantes por apresentarem o efeito de Plasmon de Superfície Localizado (LSP – sigla em inglês), e têm sido estudadas para aplicação fototérmica.[32] Para entender este fenômeno, precisamos recorrer à física: ocorre que, ao absorver luz, os elétrons presentes na superfície de uma NP metálica são excitados, causando um deslocamento da nuvem eletrônica em relação ao núcleo. Nesta condição ocorre uma separação de cargas (núcleo positivo em relação aos elétrons negativos), que origina uma força coulômbica no sentido de restaurar esta separação, levando a uma sequência de oscilações de vai e vem da nuvem eletrônica na superfície da NP.[33] Esta oscilação coerente dos elétrons da banda de condução corresponde à LSP (Figura 5). Se a frequência da oscilação for igual à frequência da luz incidente (ressonância), a NP absorverá fortemente a luz e um campo elétrico altamente amplificado será gerado em sua superfície – dando origem ao efeito de Ressonância de LSP. Ao retornarem ao estado fundamental, parte da luz absorvida pode sofrer decaimento não radiativo, convertendo-se em fônons (isto é, calor).[34] Considerando que o fenômeno de LSP depende da densidade de elétrons na banda de condução, ele é afetado por características como tamanho, forma e composição das NPs plasmônicas. Desta forma, é necessário estudar tais propriedades quando se trabalha com este tipo de material.[35]

Figura 5 - Representação de ressonância plasmônica localizada na superfície de nanopartículas de ouro (AuNPs), a partir da absorção de radiação eletromagnética.



Fonte: Adaptado pela autora.[32]

Devido às numerosas vantagens das terapias induzidas pela luz, muitos autores tem proposto o emprego combinado da TFD e TFT, e têm mostrado resultados promissores em especial para o tratamento de diversos tipos de câncer.[36] De acordo com Wei e colaboradores (2018), é possível alcançar um bom efeito terapêutico de TFD/TFT através da utilização de monômeros de porfirinas (responsáveis pelo efeito fotodinâmico) com NPs de ouro (responsáveis pelo efeito fototérmico). A combinação resultou em significativa citotoxicidade contra células Hela quando tratadas com lasers de 808 nm (TFT) e 630 nm (TFD).[37] Hu e colaboradores (2020) propuseram a aplicação combinada de TFD/TFT no tratamento de câncer de próstata, a partir de um sistema auto montável baseado em vesículas poliméricas, constituído pela combinação de um surfactante, polímero, nanobastões de ouro, e o FS indocianina verde. O formulado resultou em alto acúmulo no tecido tumoral, alta conversão fototérmica e capacidade de resistência ao fotobranqueamento.[38]

As TFD e TFT têm sido usadas em diversos campos da medicina, como no tratamento de doenças de pele, no combate à doença de Alzheimer[39], na inativação de micro-organismos causadores de doenças[40], bem como nos ramos da oftalmologia e odontologia[41], entretanto, nesta Tese o enfoque será direcionado para um dos campos da saúde que necessita com maior urgência do desenvolvimento de tratamentos eficientes, que é o câncer.

1.1.1 O câncer

O câncer é uma das patologias mais agressivas de que se tem registro, sendo a segunda principal causa de morte no mundo, ficando atrás apenas das doenças cardiovasculares. Em termos simplificados, se caracteriza pelo crescimento incontrolável de células anormais, condição passível de afetar qualquer tecido do organismo, podendo levar à formação de tumores. O termo “câncer” abrange um grupo de mais de cem condições geneticamente diversas, que apresentam semelhanças entre si em termos de mecanismo molecular, o que torna o desenvolvimento de tratamentos uma tarefa ainda desafiadora.[42]

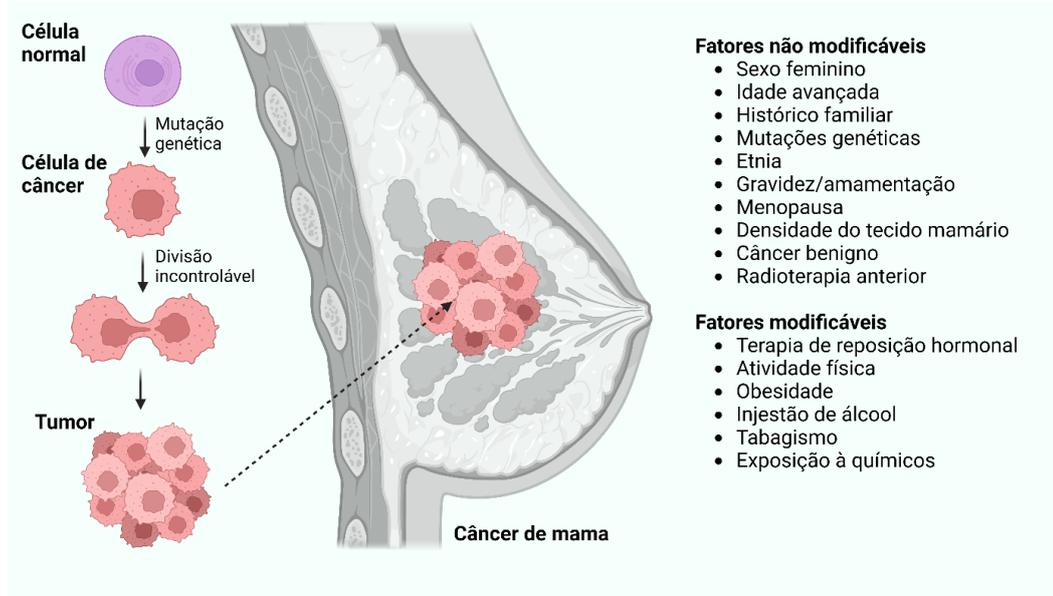
Um estudo recente publicado por Santos e colaboradores (2023) estimou que, de 2023 até 2025, 704 mil novos casos de câncer são esperados no Brasil, sendo o câncer de pele não melanoma e o câncer de mama os mais incidentes.[43] Apesar de ocorrer em maior frequência, o câncer de pele não melanoma possui uma maior facilidade de tratamento, ao passo em que o câncer de pele melanoma, que representa apenas 5% dos casos, possui um pior prognóstico e uma maior taxa de mortalidade, sendo ainda uma grande questão de saúde pública. Tendo em vista o cenário atual de saúde brasileiro, esta Tese aborda os cânceres de pele melanoma e de mama.

1.1.1.1 O câncer de mama

As mamas são formadas por células epiteliais que se estruturam de forma uniforme, constituindo tecidos glandulares, conjuntivos e gordurosos. Quando tais estruturas epiteliais passam por alterações funcionais ou morfológicas, inicia-se a formação de um tumor (Figura 6). As células tumorais possuem a habilidade de evadir-se dos mecanismos que levariam à morte celular fisiológica, e este fator combinado à rápida multiplicação que sofrem leva à formação da densa massa celular tumoral.[44] Nos casos mais agressivos, o tumor pode se expandir e passar a afetar os tecidos adjacentes e até mesmo sofrer metástase, afetando outras regiões do organismo. Os principais fatores de risco que podem levar ao desenvolvimento do câncer de mama dividem-se entre aqueles que não podem ser alterados (não modificáveis) e aqueles que podem ser alterados (modificáveis), através de um estilo de vida mais saudável, por exemplo. Dentre os fatores não modificáveis, podemos citar os fatores genéticos associados ao histórico familiar do paciente, possíveis mutações genéticas e predisposição de determinadas origens e etnias, bem como a incidência anterior de nódulo de mama benigno. No caso dos

fatores modificáveis, prevalecem aqueles relacionados com a qualidade de vida, como obesidade, tabagismo, uso de bebidas alcoólicas e alimentação rica em alimentos industrializados combinada com pouca ou nenhuma frequência de atividade física.[45], [46]

Figura 6 - Estágios de formação do câncer de mama e fatores de risco modificáveis e não modificáveis associados.



Fonte: Adaptado de Cicenas et al.[45] Criado com Biorender.com

O câncer de mama é o de diagnóstico mais frequente em mulheres em todo o mundo. Quando descoberto em estágios iniciais, a taxa de cura pode alcançar até 80% dos casos, porém, em países subdesenvolvidos como o Brasil, diagnósticos tardios são ainda frequentes, o que afeta consideravelmente a eficácia dos tratamentos convencionais. A quimioterapia é o tratamento convencional mais conhecido para o câncer, e sua aplicação depende de uma investigação detalhada do tipo de tumor mamário, que definirá o melhor fármaco a ser empregado. Sua aplicação está associada a diversos efeitos colaterais severos, como a conhecida perda de cabelo, fadiga, medula óssea suprimida, anemia, ocorrência recorrente de infecções, dentre outros.

O grande *calcanhar de Aquiles* da quimioterapia tem sido a resistência a múltiplos fármacos (MDR, do inglês *Multidrug resistance*), que ocorre quando as células de tumor conseguem sobreviver aos efeitos citotóxicos causados por uma série de medicamentos que possuem diferentes estruturas químicas e diferentes mecanismos farmacológicos. Ainda não estão esclarecidas quais as principais condições que levam à ocorrência da MDR, porém, existem evidências que apontam para a presença de uma maior quantidade de bombas de efluxo

carregadas de proteínas transportadoras no interior de determinadas células tumorais, que são capazes de expelir ativamente os fármacos. A baixa concentração do agente terapêutico no interior destas células torna a quimioterapia ineficaz.[47] É neste ponto que as fototerapias apresentam grande vantagem. Isso porque o mecanismo único pelo qual a morte celular é induzida através de TFD independe da maioria dos fatores cruciais que levam à MDR, podendo, inclusive, reativar a resposta da célula à quimioterapia. No caso de células de câncer de mama, estudos anteriores revelaram que a aplicação da luz leva a dano direto das proteínas transportadoras envolvidas na multirresistência, permitindo a entrada dos fármacos fotoativos para o interior das células alvo e assim elevando a atividade antitumoral.[48]

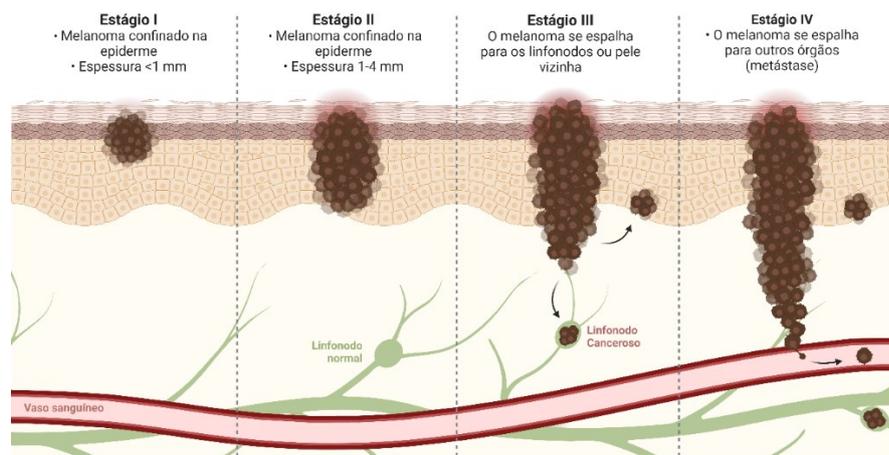
O formato através do qual as fototerapias atuam permite também a sua combinação com as terapias convencionais de tratamento de câncer. Yang e colaboradores (2022) recentemente analisaram a eficácia da combinação entre TFD e quimioterapia no tratamento de células de câncer de mama que apresentavam MDR. Para tanto, sintetizaram uma estrutura do tipo núcleo-casca, empregando como FS o corante rosa de bengala conjugado à albumina sérica humana e o fármaco quimioterápico doxorrubicina, covalentemente associado a nanopartículas de carbonato de cálcio. O sistema conseguiu acumular-se em células de câncer que apresentavam resistência à doxorrubicina quando associadas pequenas doses de TFD. O emprego da luz levou ainda a uma redução da atividade de proteínas transportadoras, o que reduziu a eliminação da droga pelas células e mostrou excelente resultado terapêutico.[49] Ainda assim, a doxorrubicina é um medicamento quimioterápico associado a uma gama de efeitos colaterais severos. Aqui, a combinação entre TFD e TFT pode ser uma alternativa para o tratamento de células de câncer de mama multirresistentes, apresentando efeitos colaterais minimizados.

1.1.1.2 O melanoma

O câncer de pele melanoma é o tipo mais agressivo de câncer de pele, com uma alta taxa de mortalidade que alcança até 20% dos casos. O melanoma se origina nas células responsáveis pela pigmentação da pele, os melanócitos, e seu desenvolvimento pode ter início em um nevo (lesão cutânea benigna pigmentada, popularmente chamada de pinta, de cor marrom com bordas regulares) ou mesmo em pele saudável.[50] O melanoma possui algumas fases de progressão, assim como demonstrado na Figura 7, sendo que nas fases iniciais, o tumor se encontra nas

camadas mais superficiais da pele (epiderme e derme – Estágios I e II) em uma fase de crescimento radial, onde ocorre um aumento de seu diâmetro e formação de bordas irregulares. Na sequência, inicia-se a fase de crescimento vertical (Estágio III), na qual o melanoma atinge a derme profunda e pode começar a se espalhar por linfonodos e em regiões vizinhas da pele. Por fim, no estágio mais grave (Estágio IV), o câncer sofre metástase, se espalhando para outras regiões do corpo, como pulmões, cérebro e outros órgãos fora do sistema nervoso central.[51]

Figura 7 – Estágios de evolução do câncer de pele melanoma.



Fonte: Adaptado de Long et al.[50] Criado com Biorender.com

Em geral, o principal fator associado ao desenvolvimento da doença é a exposição solar aos raios ultravioleta provenientes da luz solar e de bronzamentos artificiais, mas é importante destacar que existem subtipos de melanoma cujo aparecimento não tem relação com exposição à luz. Nos últimos anos, as taxas de incidência têm aumentado, principalmente em populações de pele clara, e a rapidez com que o tumor se desenvolve tem sido uma preocupação que demanda o desenvolvimento de métodos cada vez mais eficazes de tratamento, porém, os tratamentos convencionais têm apresentado ineficácia em muitos dos casos pelos motivos já discutidos na seção anterior. A remoção cirúrgica do tumor é uma das primeiras alternativas para o tratamento do melanoma, que consiste na remoção da área afetada e de suas margens laterais, garantindo assim a remoção de possíveis células cancerosas que tenham migrado para a vizinhança. Entretanto, a depender do tamanho e profundidade do tumor, nem sempre esta é uma opção viável. A quimioterapia também tem sido empregada, porém, o melanoma é um tipo de câncer que possui uma alta taxa de reincidência, e este é um fator que potencializa o desenvolvimento de resistência a múltiplos fármacos (MDR). De acordo com Tang e

colaboradores (2017), menos de 20% dos melanomas apresentam boa resposta aos quimioterápicos devido aos diversos mecanismos de resistência que apresentam.[52] Novamente, as fototerapias têm se apresentado como tratamentos alternativos que podem ser efetivos nos casos mais graves da doença, onde a nanotecnologia torna-se uma grande aliada no desenvolvimento de FS funcionalizados com biomoléculas direcionadoras que tem a capacidade de aumentar a especificidade às células alvo. Estudos já avaliaram a ação de FS no tratamento de melanomas metastáticos, inclusive. De acordo com Naidoo et al. (2018), os FS mais utilizados no tratamento de melanomas metastáticos são aqueles das famílias das ftalocianinas e das porfirinas, com destaque especial para as metaloftalocianinas, que apresentam elevado potencial e menor fotossensibilidade posterior ao tratamento.[53]

No ramo da TFD e TFT, esforços têm sido direcionados no desenvolvimento de plataformas capazes de inativar células de diversos tipos de câncer, de forma seletiva e com reduzidos efeitos colaterais – que é a principal desvantagem das terapias convencionais para o tratamento do câncer. Uma vez que não são seletivas, a radio e quimioterapia afetam não somente as células doentes, mas também as saudáveis, provocando reações severas.[54] Na seção seguinte, discutiremos de forma mais aprofundada a respeito destas plataformas, suas funções, e o estado atual da arte.

1.1.2 Fotossensibilizadores e sistemas de entrega de fármacos

Ao serem estudadas para aplicação como FS em TFD, é desejável que as moléculas apresentem determinadas características que tornarão sua aplicação mais eficaz. Em primeiro lugar é necessário que o FS apresente um alto grau de pureza, além de fácil reprodutibilidade e baixo custo. Conforme mencionado previamente, a molécula deve absorver luz na região do vermelho do espectro eletromagnético e, preferencialmente, com alto coeficiente de absorção molar. Além disso, com vistas em aplicações futuras, é interessante que a molécula apresente baixa ou nula toxicidade no escuro, e um alto rendimento de estado tripleto (ϕ_T), que então, resultará em um alto rendimento quântico de oxigênio singleto (ϕ_Δ) e/ou de EROs. Por fim, é interessante que a molécula possua certa resistência a sofrer autodegradação frente à luz (isto é, um baixo rendimento quântico de fotobranqueamento ϕ_{FB}), uma vez que os FS podem sofrer

reações fotoquímicas que levam à sua própria degradação, o que diminui sua concentração no tecido alvo e, portanto, pode comprometer a eficácia da técnica.[55], [56]

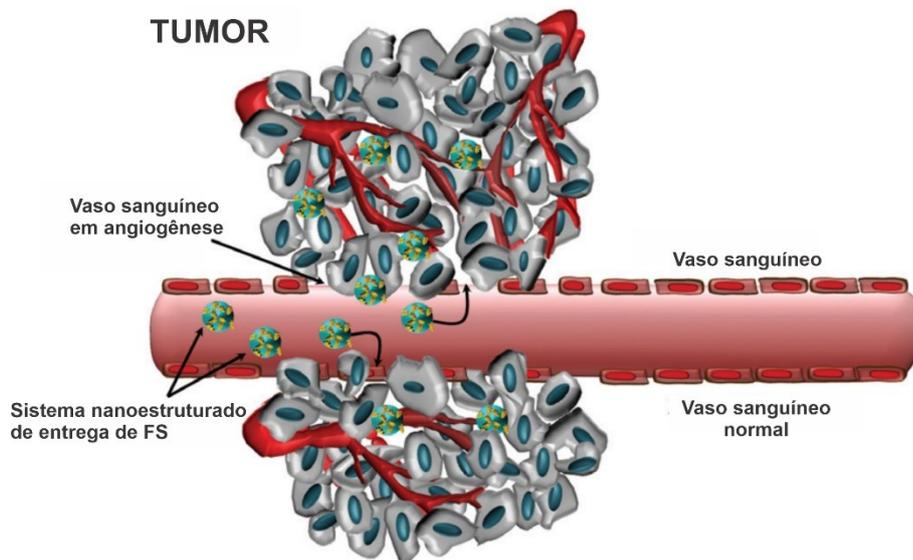
Um grande obstáculo para a aplicação e desenvolvimento de FS reside no fato de que, em geral, as moléculas que possuem as qualificações supracitadas são hidrofóbicas. Para aplicações fotodinâmicas, é essencial que a molécula se encontre em sua forma monomérica, e, como se sabe, espécies hidrofóbicas tendem a agregar-se em meio aquoso. O processo de autoagregação reduz a solubilidade do FS, reduzindo o tempo de vida do estado tripleto e, por consequência, rendimentos quânticos de $^1\text{O}_2$ e de EROs.[57] A hidrofobicidade inviabiliza a aplicação intravenosa da maioria dos FS em sua forma livre, uma vez que a água é o componente majoritário dos fluidos biológicos. Neste sentido, os sistemas de entrega de fármacos têm sido extensivamente propostos com a finalidade de encapsular FS, garantindo sua permanência na forma monomérica, o que mantém suas propriedades fotofísicas. Diversos tipos de materiais podem ser empregados na síntese destes sistemas, como, por exemplo, NPs, micelas, lipossomas, polímeros, dentre outros. A grande vantagem é que estes sistemas podem ser modificados visando um maior direcionamento ao tecido alvo, através de funcionalizações, por exemplo.[58]

Recentemente, Gusmão et al. (2022) reportaram que o FS lipofílico hipericina tornou-se solúvel após seu encapsulamento em um complexo de inclusão entre ele e β -ciclodextrina, através de um processo espontâneo, que leva a formação da partícula a partir da mistura de seus componentes. Além disso, ao ser testado contra células de câncer MCF7 – modelo celular de câncer de mama empregado em testes laboratoriais para investigação de mecanismos de resistência a fármacos –, mostrou-se 27% mais fototóxico quando comparado à forma livre do FS, resultados que revelaram a viabilidade de utilização do FS em TFD após encapsulamento.

Outro estudo realizado por Li e colaboradores (2022) propôs elevar a solubilidade de uma porfirina através da síntese de NPs montadas pela interação eletrostática entre porfirinas aniônicas e um derivado catiônico de tetrafenilmetano. A NP apresentou excelente solubilidade em água, além de eficácia antitumoral via TFD *in vitro* e *in vivo*. [59] Pires et al. (2020) empregaram uma apohemoglobina (hemoglobina sem grupo heme) capaz de se ligar eficientemente a FS hidrofóbicos. No caso em questão, o FS Ftalocianina de Alumínio foi ligado à proteína e sua incorporação impediu a autoagregação em meio aquoso, retendo as propriedades espectrais do FS. O complexo apresentou maior capacidade de geração de $^1\text{O}_2$, apresentando eficácia em TFD em células de câncer humano e murino *in vitro*. [60]

O emprego da nanotecnologia na produção de sistemas nanoestruturados de entrega de FS é uma estratégia vantajosa que leva a obtenção de materiais de elevada estabilidade, especificidade e biocompatibilidade, que podem beneficiar-se do efeito de retenção e permeabilidade aumentada dos tumores (do inglês *Enhanced Permeability and Retention Effect*, EPR). O efeito EPR é bem aceito para explicar a fisiopatologia de tumores sólidos, já tendo sido reportado em animais e em humanos.[61] É bem definido na literatura que os vasos sanguíneos tumorais apresentam alta permeabilidade para sistemas nanoestruturados, e isso se deve à grande demanda de oxigênio e nutrientes que estes tecidos solicitam, levando ao desenvolvimento de uma vasculatura abundante e fenestrada. Estas fenestrações presentes nos vasos sanguíneos tumorais não são reportadas nos vasos sanguíneos que irrigam tecidos saudáveis, e este fator leva a uma acumulação preferencial de macromoléculas nos tecidos cancerosos (Figura 8). Em paralelo, os tumores apresentam pobre drenagem linfática, o que prolonga o tempo de retenção dos sistemas nanoestruturados.[62]

Figura 8 – Representação do efeito EPR em um tumor, evidenciando a presença de fenestrações nos vasos sanguíneos tumorais, ausentes nos tecidos saudáveis.



Fonte: Adaptado de Kozlova (2013).[63]

O acúmulo seletivo a partir do efeito EPR pode ocorrer através de dois mecanismos: passivo e ativo. O direcionamento passivo é um acúmulo físico do sistema nanoestruturado através das fenestrações vasculares, que possuem tamanho variando entre 100 e 500 nm.[64]

Desta forma, os sistemas de entrega de FS devem ser estruturados para que apresentem tamanho final inferior ao intervalo mencionado. Por outro lado, o direcionamento ativo baseia-se na funcionalização de um dos componentes do sistema nanoestruturado com uma molécula (normalmente vitaminas) que possua um ligante receptor no tecido alvo. As células tumorais superexpressam em sua superfície ligantes receptores (antígenos específicos de tumor) que as distinguem das células saudáveis, nas quais esses antígenos se fazem ausentes. Esses antígenos podem ser exclusivos de um tipo individual de tumor, ou comum em uma gama de tumores, e auxiliam na internalização dos sistemas de entrega de FS através de endocitose mediada por receptores.[65] O direcionamento ativo é aplicado como estratégia complementar ao direcionamento passivo.

O planejamento de sistemas de entrega de FS direcionáveis tem apresentado vantagens em relação aos tradicionais sistemas não direcionáveis, tais quais: maior seletividade celular, internalização e citotoxicidade.[66] Como um exemplo, Tseng et al. (2021) empregaram folato como agente direcionador. No trabalho, uma micela polimérica fluorada conjugada com folato foi empregada como sistema de entrega de um FS hidrofóbico (Clorina e6), e sua citotoxicidade *in vitro* foi avaliada em células Hela sob iluminação. Os resultados mostraram uma maior inibição do crescimento celular, que foi alcançado graças à internalização seletiva (direcionamento ativo e passivo) proporcionada pela funcionalização com folato.[67] Além do folato, outras vitaminas como a biotina, a vitamina B12 e a riboflavina são essenciais para os processos de divisão celular de células de câncer. Por esta razão, estas vitaminas também têm sido empregadas como agentes direcionadores visando direcionamento ativo, em especial a biotina.

Dentre os materiais variados que têm sido propostos para a confecção de sistemas nanoestruturados de entrega de FS, grande interesse tem se voltado aos poliméricos, e isso se deve a características como o seu baixo custo, variada disponibilidade comercial, e principalmente pela facilidade de modificação de sua superfície, que permite funcionalização e ajuste de propriedades.[68] Polímeros podem ser empregados na síntese de NPs poliméricas, complexos de inclusão, complexos eletrolíticos, micelas, e entre outros. Um exemplo disto é o trabalho publicado por Silva e colaboradores (2021), em que uma nanoestrutura composta por lipídios e porfirina foi recoberta pelo polímero quitosana. A inclusão da quitosana proporcionou potencial Zeta superficial positivo e tamanho de aproximadamente 130 nm, que é compatível para efeito EPR passivo em futuras aplicações *in vivo*. Os estudos *in vitro* revelaram maior

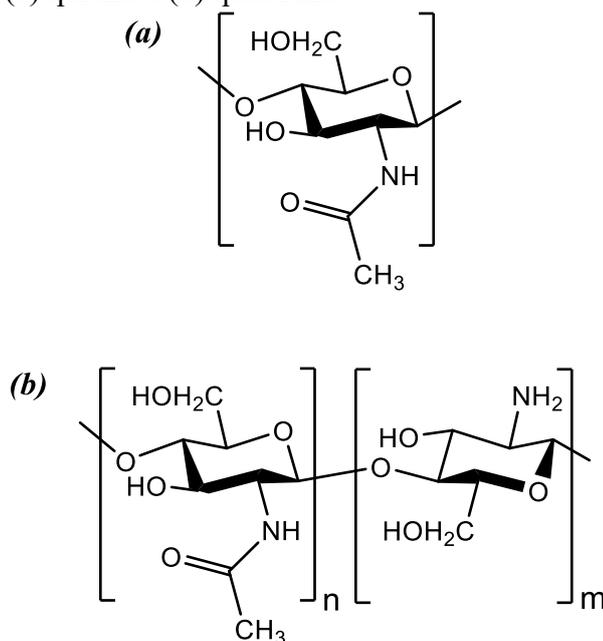
citotoxicidade da nanopartícula contra células de câncer de bexiga, em relação ao FS em sua forma livre. Além disso, as análises também revelaram propriedades mucoadesivas que foram associadas ao potencial Zeta positivo da NP de quitosana.[69]

Como pode-se perceber, a quitosana é um polímero que tem sido amplamente citado em muitos trabalhos inovadores envolvendo o desenvolvimento de sistemas de entrega de fármacos. Na próxima seção será feita uma breve revisão sobre a quitosana, bem como sua aplicação em TFD/TFT.

QUITOSANA

- 1.2 Encontrada em abundância na natureza, em exoesqueletos de crustáceos e nas paredes celulares de fungos, a quitina (Figura 9a) é um polissacarídeo composto por unidades repetidas de *N*-acetil-*D*-glucosamina, essencialmente insolúvel em água, o que impossibilita seu emprego no campo da biomedicina. A partir de sua desacetilação parcial, obtêm-se a quitosana (Figura 9b), um polissacarídeo linear formado por subunidades de β -(1,4)-2-amino-2-deoxi-*D*-glucopiranosose e pequenas quantidades de *N*-acetil-*D*-glicosamina.[70], [71] Em geral, as reações de desacetilação levam à uma quitosana com um percentual residual de 10 a 30% de grupos amida.

Figura 9 – Estrutura da (a) quitina e (b) quitosana.



As propriedades da quitosana estão intimamente relacionadas ao grau de desacetilação e à massa molar. Ao contrário da quitina, a quitosana possui grupos amino livres (Figura 9b) que podem ser protonados, o que a torna solúvel em meios ácidos ou levemente ácidos. Ainda assim, em ambientes cujo pH é superior a 6,5, ou mesmo em solventes orgânicos, a quitosana é insolúvel, o que prejudica sua aplicação em sistemas biológicos. São propriedades como biocompatibilidade, não toxicidade, biodegradabilidade e mucoadesividade que justificam sua amplitude de aplicações biológicas. Além disso, estudos já mostraram que a quitosana pode apresentar propriedades antitumorais[72], antimicrobianas[73] e antioxidantes[74]. É eficaz para impedir o crescimento bacteriano e provocar a morte de micro-organismos, através de mecanismos de destruição da membrana celular e penetração da quitosana, levando a disfunções celulares.[75] Além disso, a grande quantidade de grupos amino livres modificáveis em sua estrutura torna a quitosana um polímero atrativo para aplicação em diversas áreas da bioquímica e medicina.

A quitosana têm sido extensivamente empregada no desenvolvimento de sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos, incluindo FS para aplicação nas TFD e TFT. Na literatura, já foram reportados diversos derivados modificados de quitosana, capazes de se automontar formando NPs com cavidade hidrofóbica capazes de encapsular FS pouco solúveis em água. Um exemplo é o trabalho do grupo de pesquisa de Chen et al. (2020), que desenvolveu NPs de quitosana para encapsulamento tanto do agente fototérmico IR780 – que provoca morte celular através de hipertermia – quanto do agente fotodinâmico ácido aminolevulínico (5-ALA – cujo produto metabólico é o FS Protoporfirina IX), afim de combinar as técnicas de TFD e TFT, para tratamento de câncer de cólon. Estudos mecanísticos revelaram que o sistema de entrega pode elevar a produção de EROs e $^1\text{O}_2$, além de ter apresentado eficácia terapêutica *in vivo*, sem causar efeitos adversos, destacando o potencial emprego destas NPs de quitosana no tratamento de câncer de cólon.[76] Em 2018, Belali e colaboradores desenvolveram um hidrogel à base de quitosana, ao qual foram conjugados dois FS hidrofóbicos, funcionalizados com folato, desenhado para atuar como um sistema de liberação sensível ao pH. O estudo revelou que a presença de quitosana eliminou o problema de agregação do FS em meio aquoso e contribuiu para um aumento do rendimento quântico de $^1\text{O}_2$. Análises de fototoxicidade mostraram que o sistema apresentou excelente capacidade de destruir células de câncer seletivamente em TFD, sem danificar as células saudáveis.[77]

Devido ao fato de a quitosana apresentar caráter catiônico em meio ácido, ela interage fortemente com substâncias aniônicas, tais como proteínas, lipídeos e uma série de outros materiais, e, por conta disso, ela tem sido empregada na obtenção de complexos polieletrólíticos (CPEs). Trabalhos recentes têm evidenciado a formação de complexos quitosana/poliânion, levando a formação de nanoestruturas que são destinadas ao encapsulamento de fármacos, vacinas e FS. Em geral, estes CPEs são obtidos a partir de um processo nomeado coacervação, em que uma solução do poliânion é gotejada sob uma solução de quitosana. Como a síntese de CPEs evita o uso de solventes orgânicos tóxicos, uma vez que ocorre através da automontagem dos polímeros em solução aquosa, são considerados atrativos sistemas de entrega de fármacos. Um exemplo é a combinação entre quitosana e alginato, capaz de levar a formação de CPE mantidos por forças eletrostáticas mecanicamente estáveis, assim como reportado por Saether et al (2008).[78] CPEs formados pela junção entre quitosana e ácido hialurônico também são empregados como dispositivos para implantes e como transportadores de fármacos.[79] Novas formas de CPEs entre quitosana e poli(ácido acrílico) (PAA), alginato, heparina, carboximetilcelulose e quitina já foram estudadas, onde-se analisaram-se as interações entre membranas de CPEs e proteínas plasmáticas.[80]

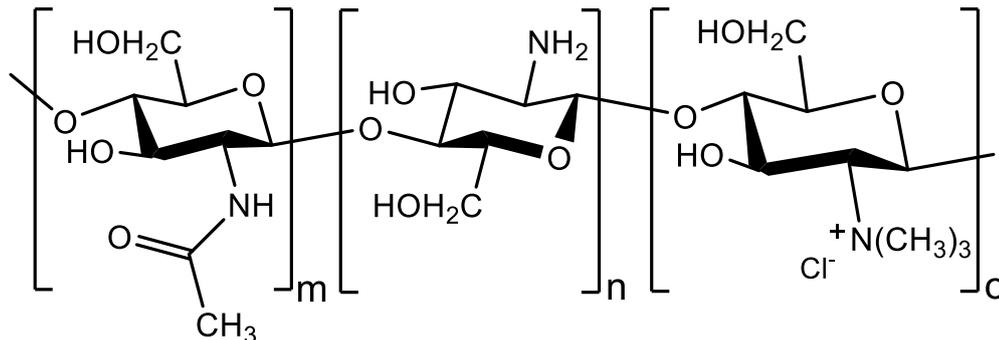
Apesar do destaque nestes estudos, a redução drástica da solubilidade da quitosana a medida em que se avança na escala de pH dificulta sua aplicação no campo da biomedicina. A quitosana comercial, por exemplo, apresenta um pK_a intrínseco na faixa de 6,5 e apenas cerca de 24 % de seus grupos aminos primários encontram-se protonados em meio ácido. Para evitar esta inconveniência, é interessante trabalhar com seus derivados quaternários, que apresentam uma carga positiva fixa no átomo de nitrogênio, o que confere alta solubilidade até mesmo em soluções neutras.[71] Nesta Tese abordaremos com maior profundidade dois deles: a *N,N,N*-trimetil quitosana (TMC) e o *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana.

1.2.1 *N,N,N*-Trimetil quitosana (TMC)

A TMC (Figura 10) é o produto da metilação dos grupos amino da quitosana, reação que pode gerar TMC com diferentes graus de quaternização (GQ). O GQ, ou densidade de carga, representa o número de cargas positivas na molécula que poderá, então, interagir com sítios de carga negativa na membrana epitelial no organismo.[81] Sendo assim, polímeros como a TMC podem ser utilizados como biomateriais para o desenvolvimento de sistemas de entrega

de fármacos, pois conforme comentado anteriormente, podem aumentar a mucoadesão e a permeabilidade nas células epiteliais, favorecendo a absorção do fármaco encapsulado.[82] Muitos grupos de pesquisa têm direcionado esforços para definir o GQ mais adequado para este tipo de aplicação da TMC, e investiga-se que um GQ próximo de 50% apresente resultados satisfatórios.[83]

Figura 10 – Estrutura geral da *N,N,N*-trimetil quitosana (TMC).



Alguns estudos mostram o emprego de TMC para encapsulamento de fármacos e emprego em terapias de câncer. Nguyen-Trinh e colaboradores (2021) investigaram a formação de micelas de complexo poliíon utilizando TMC e PAA, visando encapsular doxorrubicina (medicamento quimioterápico), e os resultados biológicos no tratamento *in vitro* de células de câncer de colón murino revelaram que o fármaco encapsulado apresentou atividade anticâncer consideravelmente superior em relação a sua forma livre.[84]

Já foi comprovado que a TMC é capaz de encapsular FS para aplicação em TFD. A TMC já foi empregada para encapsulamento de bufanila, por um processo baseado em interações eletrostáticas, formando nanopartículas recobertas com albumina sérica humana medindo aproximadamente 30 nm, que exerceram alta fototoxicidade contra linhagens celulares de câncer de mama e pulmão.[85] A TMC já foi empregada como revestimento de nanopartículas metálicas com o objetivo de aumentar sua biocompatibilidade. É o caso de um estudo recente de Bangde et al. (2022), que empregaram nanopartículas de paládio recobertas com TMC para TFT contra células de câncer de mama MDA-MB231 (linhagem celular de câncer de mama, isolada pela primeira vez na década de 70 de uma paciente com carcinoma mamário metastático, em metástase pleural). Os testes *in vitro* revelaram que a cobertura com TMC aumentou o acúmulo das NPs nas células de câncer, em comparação às NPs revestidas

com quitosana. Além disso, apresentaram maior estabilidade do que as NPs de paládio não revestidas, apresentando efeito terapêutico fototérmico.[86]

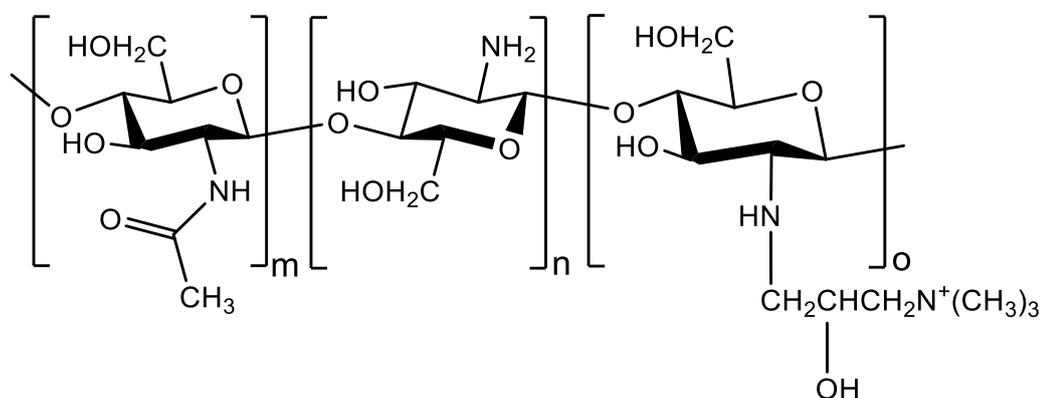
A TMC foi empregada na síntese de CPEs com alginato para encapsulamento de NPs de prata e aplicação biológica *in vitro* contra células de câncer de cólon. O CPE foi capaz de promover boa estabilização das NPs de prata em pH gástrico, promovendo liberação sustentada das mesmas em pH fisiológico (7,4), em concentração suficiente para apresentar citotoxicidade para as células de câncer sem afetar células saudáveis.

Apesar da grande quantidade de estudos aplicando TMC na síntese de variados tipos de sistemas nanoestruturados de entrega de fármacos, poucos tem sido destinados para encapsulamento de FS e aplicações fotodinâmicas no tratamento do câncer, o que nos abre um amplo campo de estudo. O polímero catiônico *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana, também é um tipo de derivado quaternário de quitosana, apresenta vantagens semelhantes que serão discutidas no tópico a seguir.

1.2.2 *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC)

O polímero nomeado *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (sigla em inglês HTCC – Figura 11), assim como a TMC, é um derivado quaternário hidrossolúvel da quitosana, que pode ser obtido a partir da reação da quitosana com cloreto de trimetil glicidil amônio. Ele também tem sido aplicado na obtenção de sistemas de entrega de fármacos para emprego em diversos campos da biomedicina. Estudos já demonstraram sua eficácia no encapsulamento de diversos fármacos, como ribavirina[87], insulina[88], curcumina[89] e muitas outras.

Figura 11 – Estrutura geral do *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio (HTCC).



O HTCC já foi empregado na obtenção de NPs polieletrólíticas em um processo de automontagem com sulfato de dextrana, através de interações eletrostáticas entre os dois polímeros. No estudo em discussão, de Shu et al. (2011), os pesquisadores escolheram o HTCC em desfavor à quitosana, uma vez que aquele apresenta-se solúvel em toda a faixa de pH, fator que corrobora para maior estabilidade das NPs.[90] Em outro estudo, o HTCC foi aplicado como carreador de um fármaco muito empregado no tratamento de câncer de pulmão (Paclitaxel), por Lv et al. (2011), que obtiveram NPs de aproximadamente 130 nm, e apresentaram acumulação preferencial nos tecidos subcutâneos de tumores (*in vitro*) como resultado do efeito EPR.[91] Com uma proposta diferente, o HTCC foi empregado junto a glicerofosfato na síntese de um hidrogel termossensível, utilizado como matriz para o carregamento de lipossomas carregadas com doxorubicina, e futura aplicação em tratamento de câncer. Os testes *in vivo* demonstraram que o hidrogel elevou a atividade antitumoral, reduzindo a toxicidade sistêmica no organismo dos camundongos.[92]

Apesar dos estudos promissores, não se encontram na literatura muitos estudos empregando o HTCC na construção de sistemas nanoestruturados de entrega de FS para aplicação em TFD, o que abre espaço de estudo nesta direção, estratégia que será abordada nesta Tese.

**PLATAFORMA BASEADA EM NANOPARTÍCULAS DE OURO
FUNCIONALIZADAS COM AZUL DE METILENO, RECOBERTAS COM N-(2-
HIDROXI)PROPIL-3-TRIMETILAMÔNIO QUITOSANA: SÍNTESE,
CARACTERIZAÇÃO E APLICAÇÃO BIOLÓGICA *IN VITRO*.**

INTRODUÇÃO

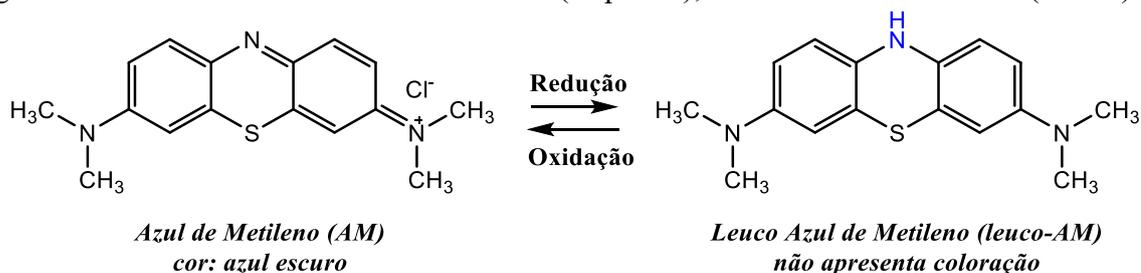
Na busca de tratamentos alternativos com efeitos colaterais reduzidos para variados tipos de câncer, a Terapia Fototérmica (TFT) tem sido estudada a partir da aplicação das já mencionadas nanopartículas metálicas, que são capazes de converter fótons em energia térmica e provocar dano celular por hipertermia. As nanopartículas de ouro (AuNPs) são um excelente exemplo de NPs metálicas capazes de produzir alta eficiência de conversão fototérmica, por se tratar de uma classe de materiais únicos que apresentam o efeito de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (RPSL, já discutido na Seção 2.1 desta Tese). Além disso, elas possuem baixa citotoxicidade, o que é desejável quando se desenvolvem sistemas para aplicações biológicas; fácil síntese, além de oferecerem a possibilidade de funcionalização de sua superfície.[93] Outro ponto atrativo para seu emprego em TFT é a possibilidade de administrar-se as AuNPs diretamente na região do tumor – com o auxílio dos sistemas de entrega –, o que reduz os possíveis efeitos colaterais associados à distribuição não específica que outra via de administração poderia oferecer.[94]

Quando plataformas para a fotoativação de células são desenvolvidas, busca-se investigar a condição em que o sistema pode oferecer a melhor performance terapêutica possível. Uma estratégia interessante que vem sendo proposta para alcançar um maior efeito terapêutico consiste em combinar TFT e TFD, através da manipulação de um sistema que contenha ambos os agentes fototérmico e fotodinâmico, irradiados por uma única fonte de luz. As AuNPs têm sido empregadas, nesta direção, como plataforma para o carregamento de FS, possibilitando a combinação das duas técnicas. Nestes casos, é imprescindível que as propriedades dos materiais empregados sejam analisadas antes e após a conjugação, uma vez que mudanças estruturais e espaciais podem alterar as propriedades fotoquímicas e fotofísicas das moléculas envolvidas. Em algumas estratégias a nanopartícula é empregada sem ancoramento ao FS, como é o caso do estudo publicado por Amini et al. (2013), em que AuNPs e ácido 5-aminolevolênico (FS) foram empregados em conjunto para testes *in vitro* contra uma linhagem celular de carcinoma epidérmico. O estudo revelou o potencial das NPs em aumentar a performance fotodinâmica do FS.[95] Por outro lado, diferentes vias podem ser exploradas para promover uma funcionalização da NP com o FS, empregando forças intermoleculares, por exemplo. Interações eletrostáticas já foram utilizadas para promover a conjugação entre AuNPs e o FS azul de metileno, por Darabpour et al. (2016), e o sistema foi aplicado para inativação

fotoinduzida de uma bactéria resistente a antibióticos (*Staphylococcus Aureus*). Neste estudo, mais uma vez, as AuNPs elevaram a eficácia fotodinâmica do FS, e o resultado foi atribuído à maior produção de EROs detectada, que pode ser uma consequência do efeito de ressonância das NPs.[96] Outros estudos já reportaram que as AuNPs possuem a capacidade de alterar propriedades fotoquímicas do FS azul de metileno[97], [98] entretanto, poucos são aqueles que empregaram este sistema para inativação de células tumorais, tendo sido o foco principal a microbiana. Ainda é necessário, também, explorar o efeito sinérgico que a combinação entre NPs e FS pode oferecer.

O azul de metileno (AM – Figura 12) ou cloreto de 3,7-bis(dimetilamino)fenazatiônio é um corante de baixo custo, hidrossolúvel e catiônico, pertencente à classe dos compostos fenotiazínicos, que possui uma coloração azul única derivada da forte banda de absorção que apresenta na região de 550 a 700 nm. Além disso, apresenta máxima absorção de luz em comprimento de onda próximo de 664 nm, bem como altos rendimentos quânticos de estado tripleto ($\phi_T \sim 0,52$) e de geração de 1O_2 ($\phi_\Delta \sim 0,5$) – dados para etanol ou solução aquosa diluída –, o que viabiliza sua aplicação em fototerapias. De fato, o AM é um FS conhecido, e sua eficácia em TFD e na inativação fotodinâmica de micro-organismos já foi comprovada em diversos estudos.[99] Entretanto, quando aplicado em sua forma livre, o AM pode causar uma série de efeitos colaterais indesejáveis (mesmo quando não há exposição à luz), dentre eles podemos citar a necrose tecidual, hipertensão, asma e náuseas. Além disso, apesar de ser um FS solúvel em água – o que é uma característica rara tratando-se de FS –, o AM não é estável em meio biológico, sendo imediatamente reduzido à sua forma *leuco* (Figura 12) que não apresenta absorção na região do visível devido a perda de conjugação das ligações duplas em seus anéis, o que o torna inativo para aplicações fotodinâmicas.[100] Por essas razões, a aplicação do AM em sua forma livre é inviabilizada, e muitos pesquisadores têm empregado esforços no desenvolvimentos de sistemas de entrega que viabilizem sua aplicação *in vivo*.

Figura 12 –Estrutura do FS Azul de Metileno (esquerda); Estrutura do Leuco-AM (direita).



Dentre os materiais mais cotados para a síntese de sistemas de entrega, os poliméricos têm recebido especial interesse nos últimos anos, devido às inúmeras vantagens que oferecem, tais como possibilidade de modificação e ajuste de propriedades, biocompatibilidade, baixo custo e biodegradabilidade. Assim como destacado na revisão bibliográfica desta Tese (seção 1.2), a quitosana e seus derivados são materiais que oferecem as vantagens supracitadas, e seu emprego na síntese de sistemas de entrega tem sido estudado para avaliar seu potencial para recobrimento dos sistemas, capacidade de fotoproteção do FS encapsulado, estabilidade frente à luz, capacidade de formação de estruturas nanométricas organizadas, dentre outros. O *N*-(2-hidroxi)-propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC) é um importante derivado da quitosana, que recebeu atenção nos últimos anos por seu caráter catiônico, o que possibilita a produção de sistemas automontados de entrega de FS, formados a partir de forças intermoleculares. A obtenção de sistemas por essa via dispensa reações químicas onerosas, que envolveriam o uso de solventes e reagentes tóxicos, que podem ser de difícil remoção. Para exemplificar, alguns trabalhos publicados na literatura empregaram interações eletrostáticas para promover a interação entre os componentes do sistema. Um exemplo é o trabalho de Yen et al. (2018), que prepararam AuNPs catiônicas empregando glucose em meio básico, como agente redutor, na presença de HTCC, e obtiveram nanopartículas estáveis, de potencial Zeta positivo, que apresentaram boa absorção por células de câncer.[101] Recentemente, Fan e colaboradores (2023) empregaram HTCC na síntese de um compósito com amilose, para encapsulamento de AuNPs através de interações eletrostáticas entre os componentes. Neste caso, o compósito se provou capaz de interagir com duas proteínas derivadas do vírus SARS-CoV-2 por vias também eletrostáticas, formando duas subunidades de vacinas que mostraram potencial para estimular o sistema imunológico.[102] Apesar de o HTCC apresentar potencial para a síntese de sistemas nanoestruturados para aplicações biológicas, a sua aplicação em TFD e TFT combinadas ainda é um campo da ciência que não foi explorado.

OBJETIVOS

Com base no que foi relatado acima, o objetivo geral da **Parte I** desta Tese consistiu na síntese e caracterização do sistema denominado HTCC-AM-AuNPs, idealizado para aplicação combinada de Terapia Fototérmica (empregando AuNPs) e Terapia Fotodinâmica (empregando AM). Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram delineados:

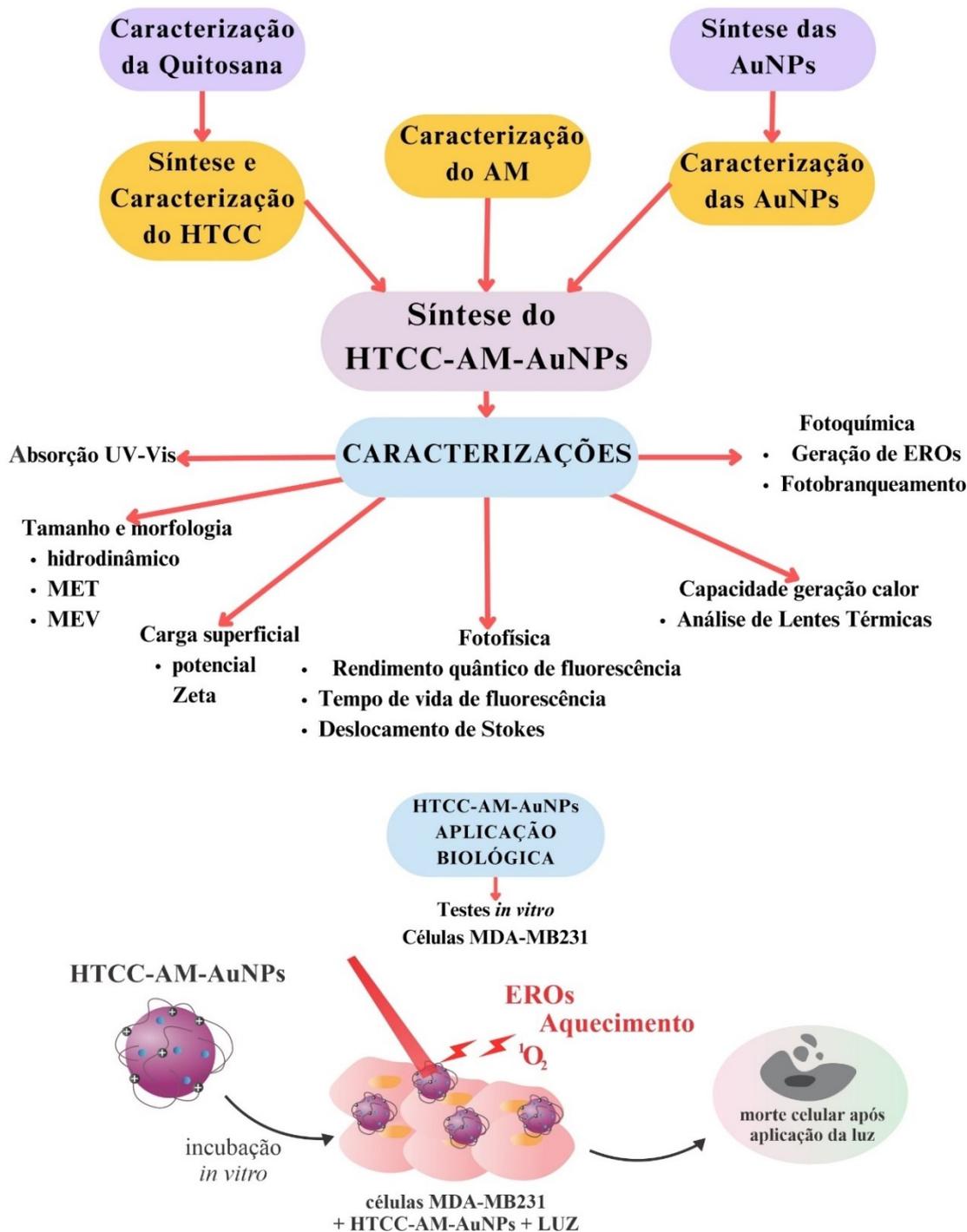
- Sintetizar AuNPs com carga superficial residual aniônica, empregando-se como agente estabilizante citrato de sódio;
- Sintetizar o polímero catiônico derivado da quitosana, HTCC; e determinar seu grau de substituição;
- Funcionalizar as AuNPs com o FS catiônico AM, e posteriormente recobrir o sistema com o polímero catiônico HTCC, através de interação eletrostática entre os componentes do sistema, dando origem ao conjugado HTCC-AM-AuNPs;
- Caracterizar o conjugado quanto ao seu tamanho e potencial Zeta, e contrastar os dados com o material de partida (AuNPs);
- Determinar os perfis de absorção UV-Vis de AuNPs e AM antes e após a conjugação em HTCC-AM-AuNPs;
- Avaliar os rendimentos quânticos de emissão de fluorescência do AM antes e após conjugação;
- Determinar a capacidade de conversão fototérmica do conjugado;
- Verificar a capacidade do conjugado, das AuNPs livres e do AM livre em produzir EROs frente à luz, a partir de cinéticas de degradação com ácido úrico;
- Avaliar a citotoxicidade do HTCC-AM-AuNPs contra células de câncer de mama MDA-MB231 *in vitro*, combinando TFD/TFT, e comparar com o efeito isolado de AuNPs livres, AM livre e do intermediário HTCC-AuNPs – no escuro e na presença de luz.

PARTE EXPERIMENTAL

O Fluxograma 1 mostra o passo a passo metodológico que foi empregado para caracterização e aplicação do sistema proposto na **Parte 1**.

2.3

Fluxograma 1 – Metodologias aplicadas na Parte I.



MATERIAIS

Todas as soluções aquosas utilizadas na parte experimental I desta Tese de Doutorado foram preparadas utilizando água ultrapura Milli-Q (resistividade > 18 MΩ cm).

- 2.4 A quitosana comercial de baixa massa molar (MM = 50000 – 190000 Da, grau de desacetilação de 74%, CAS: 9012-76-4), o reagente cloreto de glicidil trimetil amônio (C₆H₁₄ClNO, MM = 151,63 g mol⁻¹, CAS: 3033-77-0), o precursor de íons ouro III (Au³⁺) ácido cloroáurico tri-hidratado (HAuCl₄.3H₂O, MM = 393.80 g mol⁻¹, CAS: 16961-25-4) e o agente estabilizante citrato de sódio tribásico diidratado (NaCt; C₆H₅O₇Na₃.2H₂O, MM = 294,10 g mol⁻¹, CAS: 6132-04-3) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich. O FS catiônico Azul de metileno (AM, C₁₆H₁₈ClN₃S, MM = 319,85 g mol⁻¹, CAS: 61-73-4) foi adquirido da Vetec.

As sondas dimetilsulfóxido (DMSO) de alta pureza, azida de sódio (NaN₃, MM = 65,01 g mol⁻¹, CAS: 26628-22-8) e 5,5-dimetil-1-pirrolina-N-óxido (DMPO, C₆H₁₁NO, MM = 113,16 g mol⁻¹, CAS: 3317-61-1) foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

2.5 INSTRUMENTAÇÃO

Grande parte dos dados experimentais reportados nesta Tese foram obtidos nos laboratórios 203, 312 e 313 do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), pertencentes ao Laboratório de Catálise e Fenômenos Interfaciais – LACFI, associado ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia – Catálise em sistemas moleculares e nanoestruturados (INCT-Catálise).

As medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Microscopia Eletrônica de Varredura foram realizadas no Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC.

Os experimentos de Análise de Lentes Térmicas foram realizados pelo Professor Dr. Luis Carlos Malacarne, do Departamento de Física da Universidade Estadual do Maringá – UEM (Paraná, Brasil).

Os testes biológicos *in vitro* foram realizados em parceria com o Professor Dr. Alfeu Zanotto Filho, no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer (LabCancer) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

As medidas de tamanho hidrodinâmico e de potencial Zeta foram obtidas com o equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern, do laboratório pertencente ao Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (Polimat) do Prof. Dr. Alexandre Parize (UFSC).

As análises de difração de raios X foram realizadas pelo Prof. Dr. Adailton João Bortoluzzi, os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio foram obtidos com o auxílio da Ma. Larissa Campos e de Glauber Renan de Lima, e as análises de Espectrometria de Infravermelho e Análise Elementar foram produzidas pelo Dr. Nilton Cezar Pereira, todas realizadas com os equipamentos da Central de Análises do Departamento de Química da UFSC.

As análises de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram realizadas em conjunto com o Prof. Dr. Adolfo Horn Junior, na Central de Análises.

As cubetas utilizadas neste trabalho são fabricadas em quartzo, com duas ou quatro faces translúcidas. Também foram utilizadas cubetas de policarbonato do tipo célula capilar com eletrodos integrados (Malvern) para medidas de potencial Zeta.

Todos os frascos e vidrarias utilizados no preparo das AuNPs foram rigorosamente limpos, imersos em água régia por 24 h e posteriormente lavados por diversas vezes com água destilada, e por fim com água deionizada altamente pura. O devido controle de limpeza do laboratório foi mantido. Após secas, as vidrarias foram utilizadas nos processos de síntese, preparo de soluções e estoque, evitando seu armazenamento e acúmulo de poeira e sujidades ao longo dos dias.

2.6

METODOLOGIA

2.6.1 Caracterização do material de partida – Quitosana

A quitosana comercial (Sigma-Aldrich) foi caracterizada a partir das diferentes técnicas descritas a seguir, a fim de determinar propriedades tais como massa molar média, composição e proporção entre as unidades monoméricas acetilada e desacetilada e constantes de dissociação ácida (pK_{as}).

2.6.1.1 Determinação da massa molar viscosimétrica média da quitosana (\bar{M}_V)

A massa molar viscosimétrica média (\bar{M}_V) da quitosana foi determinada através da sua viscosidade intrínseca $[\eta]$, com o auxílio de um Microviscosímetro Anton Paar Lovis 2000M e de um densímetro Anton Paar DMA 4500M, a 25 °C. Para efetuar as medidas, foram preparadas soluções de quitosana (na faixa de concentração de 1×10^{-4} a 5×10^{-4} mol L⁻¹) em uma solução aquosa de ácido acético 0,3 mol L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹. Primeiramente, a viscosidade absoluta (η) das amostras foi medida, inserindo-se cerca de 1 mL da amostra no densímetro e efetuando a leitura de densidade. Em seguida, uma alíquota de 100 uL da amostra foi transferida para um tubo capilar de 1,59 mm de diâmetro, junto a uma esfera de prata. A densidade medida anteriormente foi registrada no viscosímetro antes de iniciar-se a leitura. A η é medida a partir do tempo que a esfera de prata leva para percorrer o líquido dentro do capilar.[103] Todas as leituras foram feitas em duplicata. A partir das medidas de η , pode-se calcular a viscosidade relativa (η_{rel}) através da Equação 1, a viscosidade específica (η_{esp}) pela Equação 2 e a viscosidade reduzida (η_{red}) pela Equação 3. Em soluções muito diluídas, quando a concentração de polímero tende a zero, $[\eta]$ pode ser obtida por extrapolação para encontrar o valor de y quando $x = 0$, assim como mostra a Equação 4.[104]

$$n_{rel} = \frac{n_{amostra}}{n_{solvente}} \quad (1)$$

$$n_{esp} = \frac{n_{amostra} - n_{solvente}}{n_{solvente}} = n_{rel} - 1 \quad (2)$$

$$n_{red} = \frac{n_{esp}}{C} \quad (3)$$

$$[\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{n_{esp}}{C} \quad (4)$$

onde, $\eta_{amostra}$ e $\eta_{solvente}$ são a viscosidade absoluta das soluções diluídas de quitosana e do solvente puro, respectivamente, e C é a concentração das soluções de quitosana (g L⁻¹). Uma vez determinado o valor de $[\eta]$, pode-se estimar a \bar{M}_V com base na Equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada (Equação 5), na qual K e α são constantes que dependem das interações entre polímero e solvente. Para a quitosana, as constantes encontradas na literatura: $K = 0,074$ e $\alpha = 0,76$. [105]

$$[\eta] = K(M_V)^a \quad (5)$$

2.6.1.2 Caracterização físico-química e determinação do grau de desacetilação (GD) da quitosana

Para determinação das proporções entre as unidades monoméricas da quitosana, as técnicas de RMN de ^1H , espectroscopia de infravermelho e titulação potenciométrica foram aplicadas. Por fim, a média aritmética dos GD obtidos foi considerada. As técnicas de análise elementar e difração de raios-X foram utilizadas como complemento para elucidação estrutural.

Espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H)

Para a aquisição dos espectros de RMN ^1H , 15 mg de quitosana foram dissolvidas em 500 μL de água deuterada (D_2O), adicionando-se 2 gotas de ácido clorídrico deuterado (DCl) para promover a solubilização do polímero. A amostra foi transferida para o tubo e os espectros foram adquiridos em um Espectrômetro Bruker AVANCE DRX 400 MHz. Os parâmetros de leitura foram fixados em: pulso de 45° , 128 acúmulos e um tempo de relaxamento de 10 s. O GD determinado por RMN ^1H (GD_{RMN}) foi calculado com base na Equação 6, onde $[\text{H}_2, \text{D}]$ é a integral do pico dos hidrogênios H2 correspondentes ao monômeros desacetilados em 3,10 ppm, e $[\text{H}_8, \text{Ac}]$ é a integral do pico dos hidrogênios H8' relacionados aos monômeros acetilados em 1,99 ppm.[106]

$$\text{GD}_{\text{RMN}} (\%) = \left(\frac{H_{2,D}}{H_{2,D} + H_{8,Ac}/3} \right) \times 100 \quad (6)$$

Espectroscopia de Infravermelho por transformada de Fourier (FT-IR)

Os espectros de infravermelho da quitosana foram obtidos em pastilhas de KBr em um espectrômetro Bruker (Alpha) de 256 varreduras. Os espectros foram adquiridos no modo transmitância, no intervalo de 400 a 4000 cm^{-1} e com resolução de 2 cm^{-1} . O cálculo do GD por infravermelho ($\text{GD}_{\text{FT-IR}}$) foi baseado no método descrito por Brugnerotto et al. (2001), onde as foram integradas as bandas que aparecem em: 1320 cm^{-1} (A_{1320}), referente monômeros

acetilados; e 1420 cm^{-1} (A_{1420}), referente aos monômeros desacetilados. As respectivas áreas foram aplicadas na Equação 7 para determinação do GD_{FT-IR} . [103], [107]

$$GD_{FTIR}(\%) = 100 - \left[31,92 \times \frac{A_{1320}}{A_{1420}} - 12,2 \right] \quad (7)$$

I. Titulação potenciométrica

Para o procedimento de titulação, foram previamente preparados 500 mL da solução titulante de hidróxido de potássio (KOH) descarbonatada, ou seja, preparada em água deionizada fervida (etapa importante para eliminação dos gases dissolvidos na água, principalmente dióxido de carbono que, em solução aquosa, pode formar ácido carbônico, que levará a alterações no pH do meio, levando a erro experimental). A solução de KOH foi devidamente padronizada com biftalato de potássio e sua concentração final foi determinada em $0,085\text{ mol L}^{-1}$.

Em um copo de titulação, 21,4 mg de quitosana foram diluídos em aproximadamente 20 mL de água descarbonatada. Uma solução de ácido clorídrico (HCl) foi empregada para reduzir o pH da solução até próximo de 2.0. A solução foi mantida em agitação constante, enquanto pequenos volumes da solução titulante eram adicionados com o apoio de um Titulador automático Titronic Universal, e o pH da solução era registrado a cada adição, com um medidor de pH de bancada HANNA pH meter instrument HI 113.

A curva de titulação (pH *versus* volume de KOH) foi plotada e a partir dela pode-se determinar o(s) pK_a (s) da quitosana. Os dados obtidos na titulação potenciométrica também foram utilizados para calcular um GD (GD_{TP}), e o GD_{TP} foi calculado pela Equação 8, onde 161 g mol^{-1} é a massa molar do monômero desacetilado da quitosana, $(V_2 - V_1)$ é o volume consumido entre os dois pontos de inflexão, e m é a massa de quitosana. [103]

$$GD_{TP}(\%) = \frac{161 \times [KOH] \times (V_2 - V_1)}{m} \times 100 \quad (8)$$

Ao final, o $GD_{\text{médio}}$ da quitosana foi obtido a partir de média aritmética simples, conforme Equação 9:

$$GD_{\text{médio}}(\%) = \frac{GD_{RMN} + GD_{FTIR} + GD_{TP}}{3} \quad (9)$$

II. Análise elementar

A análise elementar da quitosana foi processada em um equipamento CHN 2400 Series II PerkinElmer, operando com o gás de arraste hélio (grau 5,0), oxigênio como gás de combustão (grau 6,0), temperatura de combustão de 925 °C e temperatura de redução de 640 °C. O equipamento foi calibrado com o padrão acetanilida.

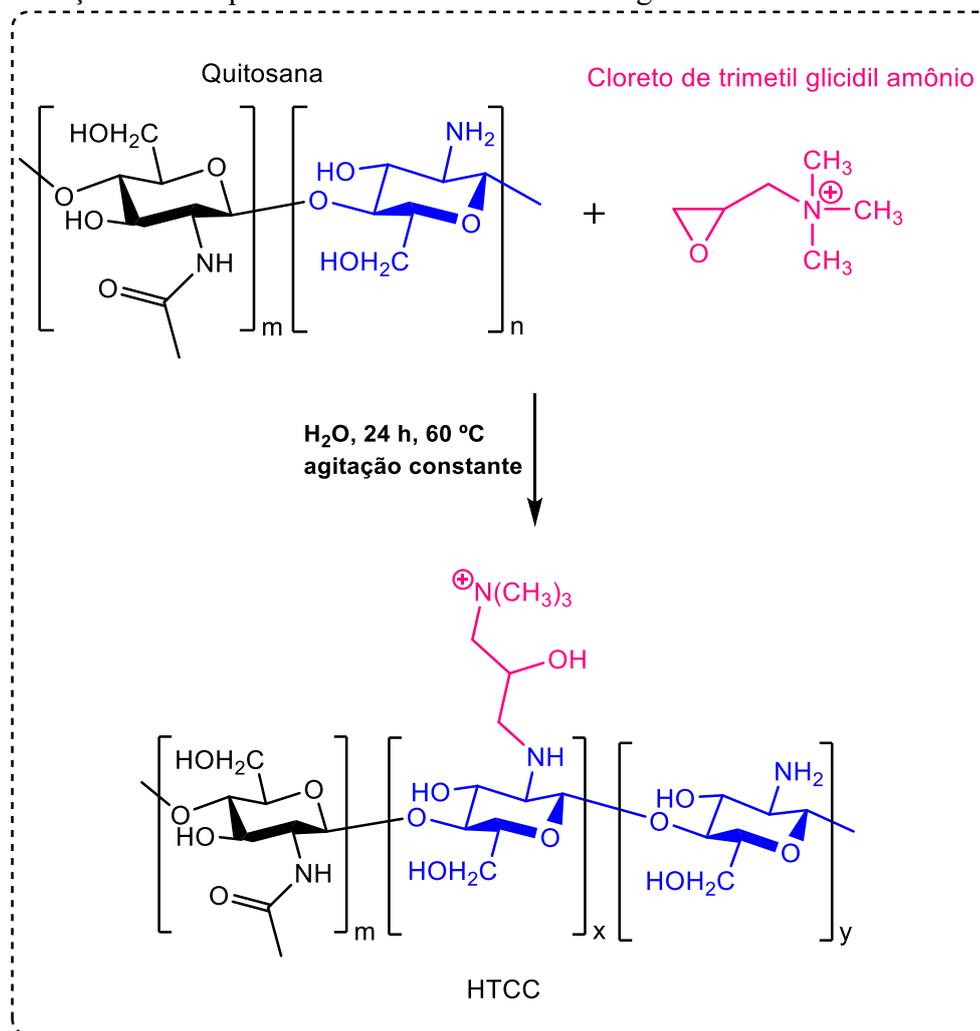
III. Análise de difração de raios X

A caracterização estrutural e cristalina da quitosana e da HTCC foram feitas usando um difratômetro de raios X (PanAlytical X'pert PRO MPD). As condições de medição foram: radiação Cu-K α $\lambda = 1,54 \text{ \AA}$, ângulo 2θ variando de 10° a 80° , a tensão foi de 40 kV e a intensidade de 30 mA.

2.6.2 Síntese, caracterização e determinação do grau de substituição (GS) do derivado catiônico cloreto de *N*-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC)

A síntese do derivado catiônico HTCC (Figura 13) foi adaptada de Fávere e colaboradores (2010)[108], 8 g de quitosana ($7,02 \times 10^{-2}$ mol) foram dispersas em 80 mL de água deionizada, com auxílio de cinco gotas de solução aquosa de HCl 4 mol L^{-1} , permanecendo em agitação constante a 60 °C durante um período de 16 h. Após, três porções iguais do reagente cloreto de trimetil glicidil amônio foram adicionados em intervalos pré-determinados de 2,5 h ($5,07 \times 10^{-2}$ mol). A reação foi mantida em 60 °C durante 24 h. Após este período, o produto HTCC foi precipitado em acetona gelada, apresentando textura gelatinosa, em seguida foi lavado com metanol. O processo de precipitação e lavagem foi repetido por três vezes para garantir a eliminação de impurezas. O HTCC foi seco em bomba de vácuo e apresentou aspecto esbranquiçado, o sólido foi macerado em cadinho de porcelana para as análises e aplicações subsequentes[109].

Figura 13 – Esquema da síntese do cloreto de *N*-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana, a partir da reação entre a quitosana e o cloreto de trimetil glicidil amônio.



Fonte: elaborado pela autora.

O HTCC foi caracterizado através de RMN de ^1H , FT-IR, análise elementar, titulação potenciométrica e difração de raios-X. Para a determinação do grau de substituição dos grupos amônio quaternários do HTCC (GS_{HTCC}) empregaram-se as Equações 10 e 11, baseando-se nas integrais dos sinais observados no espectro de RMN de ^1H , onde $\int H_3 - H_6$ se refere à integral dos hidrogênios dos carbonos C-3 ao C-6 (multipletto que vai de 3,0 a 3,6 ppm), das unidades desacetiladas, TM_3 é a integral relativa aos 9 prótons do grupo *N,N,N*-trimetil do HTCC (singletto em δ 2,82 ppm) e $\int A_C$ é a integral dos hidrogênios do C-8' das unidades acetiladas (singletto em δ 1,62 ppm).[110]

$$A_1 = \frac{(\int H_3 - H_6 - \int TM_3/9 - \int Ac/3)}{5} \quad (10)$$

$$GS_{HTCC} = \int TM_3/(A_1 \times 9) \quad (11)$$

Os procedimentos realizados para a obtenção dos espectros de FT-IR, dos dados de análise elementar, titulação potenciométrica e difração de raios-X são os mesmos já descritos na seção anterior.

2.6.3 Síntese das nanopartículas de ouro estabilizadas com citrato (AuNPs)

Em um béquer, 50 mL de uma solução aquosa de HAuCl_4 0,25 mmol L^{-1} (totalizando 0,0125 mmol) foram aquecidos até a temperatura de 100 °C, utilizando uma manta térmica de aquecimento. Ao atingir a temperatura definida, medida com auxílio de um termômetro, 20 mL de uma solução aquosa de NaCt 1,25 mmol L^{-1} (0,025 mmol) foram instantaneamente adicionados ao sistema, sob agitação rigorosa constante de 4000 rpm. Em um intervalo de tempo de aproximadamente 4 min, observou-se a variação da coloração da reação de incolor para preto, depois para roxo e por fim, a reação apresentou coloração avermelhada.[111], [112] Durante todo o procedimento, o béquer permaneceu tampado com uma placa de Petri para reduzir a perda de solvente por evaporação. Após resfriamento, a solução contendo as AuNPs foi centrifugada em uma centrífuga NovaTecnica NT 811 a 4000 rpm por 30 min. O sobrenadante foi removido e as AuNPs precipitadas foram redissolvidas em água deionizada a uma concentração final de $3,5 \times 10^{-10}$ mol L^{-1} .

2.6.4 Preparo do conjugado HTCC-AM-AuNPs

Para a síntese do conjugado HTCC-AM-AuNPs, 1 mL de solução aquosa de AuNPs ($3,5 \times 10^{-10}$ mol L^{-1}) foram pipetadas com o auxílio de uma micropipeta, e transferidas para um béquer. Na sequência, 1 mL de uma solução aquosa de AM (1×10^{-5} mol L^{-1}) foi adicionado, e o sistema permaneceu sob agitação (1000 rpm) por 1 h, formando o intermediário AM-AuNPs. Logo após, 1 mL de uma solução aquosa de HTCC (3×10^{-5} mol L^{-1} , pH 10) foi adicionado ao

sistema, que foi mantido por mais 1 h em agitação constante, dando origem ao conjugado HTCC-AM-AuNPs. Toda a síntese foi realizada com controle de temperatura, a 22 °C, e com proteção contra luz. O conjugado HTCC-AM-AuNPs foi precipitado por centrifugação a 6000 rpm, por 40 min, sendo redissolvido em água deionizada. O sobrenadante foi estocado para posterior quantificação de AM não conjugado.

Para fins de controle e comparação, também propôs-se a síntese dos intermediários listados a seguir:

- **AM-AuNPs:** 1 mL AuNPs ($3,5 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) misturado a 1 mL AM (1×10^{-5} mol L⁻¹), agitação constante (1h), centrifugação 6000 rpm (40 min);
- **HTCC-AuNPs:** 1 mL AuNPs ($3,5 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) misturado a 1 mL HTCC (3×10^{-5} mol L⁻¹, pH 10), agitação constante (1h), centrifugação 6000 rpm (40 min);

Todos os conjugados sintetizados foram estocados em solução aquosa, na geladeira, mantidos envoltos em papel alumínio, protegidos da incidência de luz.

2.6.5 Caracterizações físico-químicas das AuNPs, do conjugado HTCC-AM-AuNPs e dos controles AM-AuNPs, HTCC-AuNPs e AM livre

2.6.5.1 Determinação do coeficiente de absorção molar das AuNPs (ϵ_{AuNPs})

Após a síntese das AuNPs, foi necessária a determinação de seu coeficiente de absorção molar (ϵ_{AuNPs}), tornando possível a determinação da concentração exata das soluções de AuNPs preparadas.

A primeira etapa para determinação do ϵ_{AuNPs} foi o cálculo do número médio de átomos de ouro por nanopartícula (N), a partir da Equação 12, que considera o modelo esférico de nanopartículas. Na Eq. 12, ρ é a densidade do ouro ($19,3$ g cm⁻³), M é sua massa molar (197 g mol⁻¹), e D é o diâmetro médio (nm) das AuNPs, obtido através de Microscopia Eletrônica de Transmissão. Com o valor de N , foi possível calcular a concentração molar (C , mol L⁻¹) da solução de AuNPs, com a Equação 13, dividindo a quantia em mols de ouro adicionados na síntese das AuNPs ($N_{total} = 0,0125$ mmol), pelo produto de N , do volume da solução reacional (V , L) e da constante de Avogadro ($N_A = 6,022 \times 10^{23}$ mol⁻¹). [113]

$$N = \frac{\pi \rho D^3}{6 M} = 30.89602D^3 \quad (12)$$

$$C = \frac{N_{total}}{NVN_A} \quad (13)$$

A partir de C , foi possível construir uma curva de calibração com a solução aquosa das AuNPs, e então calcular o ϵ_{AuNPs} em 530 nm com base na Lei de Lambert-Beer (Equação 14), onde A é a absorvância e b (cm) é o caminho óptico da cubeta.[113]

$$A = \epsilon b C \quad (14)$$

2.6.5.2 Determinação do coeficiente de absorção molar do conjugado HTCC-AM-AuNPs

($\epsilon_{HTCC-AM-AuNPs}$)

O $\epsilon_{HTCC-AM-AuNPs}$ foi determinado a partir da construção de uma curva de calibração de absorvância em função da concentração do conjugado HTCC-AM-AuNPs em água, os dados foram tratados no software Origin e o coeficiente foi encontrado a partir de regressão linear, com base na Equação 14.

2.6.5.3 Medidas de espectrofotometria de absorção molecular

As AuNPs, o conjugado HTCC-AM-AuNPs e os grupos controle AM-AuNPs e HTCC-AuNPs sintetizadas e o AM livre em solução aquosa foram caracterizadas quando ao seu perfil de absorção UV-Vis, na faixa de 300-800 nm, utilizando um espectrofotômetro UV-Vis Cary 50 da Varian.

2.6.5.4 Medidas de tamanho hidrodinâmico e de potencial Zeta

Todas as medidas de tamanho hidrodinâmico e de potencial Zeta (ζ) reportadas nesta Tese foram realizadas em triplicata, utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern, pertencente ao laboratório do grupo Polimat, do Departamento de Química da UFSC. Os valores finais de tamanho e potencial Zeta foram obtidos através da média aritmética simples

dos dados encontrados. As análises foram realizadas com controle de temperatura padrão de 25 °C.

Para as medidas de tamanho hidrodinâmico, 2 mL da solução aquosa da amostra de AuNPs livres ou de HTCC-AM-AuNPs ($[AuNPs] = 3,5 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) foram transferidas para uma cubeta de policarbonato, que foi inserida no equipamento, dando início às leituras.

As medidas de potencial Zeta foram realizadas nas mesmas concentrações, injetando-se, com o auxílio de uma pipeta de Pasteur de vidro, cerca de 200 uL de amostra no interior de uma cubeta capilar com eletrodos acoplados. As medidas foram obtidas e processadas no software Zetasizer.

2.6.5.5 Morfologia e tamanho por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Todas as micrografias apresentadas nesta Tese foram adquiridas utilizando um microscópio eletrônico de transmissão JEM-1011, operado até 100 kV, que utiliza um filamento de tungstênio como fonte de elétrons, pertencente ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME – UFSC). O equipamento foi operado pela Dra. Laíze Zaramello, pós doutoranda do grupo LaCFI.

As amostras foram preparadas pingando-se uma gota da solução aquosa de AuNPs ($3,5 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$) sobre uma grade do tipo cobre-carbono para microscopia eletrônica. O excesso de solução foi removido por capilaridade, com um leve toque de papel filtro na lateral da grade. O processo foi repetido por três vezes. Por fim, a grade permaneceu por cerca de 8 h em alto vácuo para secagem, estando então pronta para ser analisada no microscópio. As imagens foram coletadas e as partículas foram contadas e medidas com o software ImageJ.

Para o preparo da grade com HTCC-AM-AuNPs, o mesmo procedimento foi executado, porém após a deposição da amostra foi aplicada uma gota de uma solução de urânio (0,05%, m/v) sobre a grade, como agente de coloração negativo.

2.6.5.6 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) com Pistola de Emissão de Campo

Um microscópio eletrônico de varredura de emissão de campo JEOL JSM-6701F incorporado com uma pistola de emissão de campo de cátodo frio e vácuo ultra alto foi utilizado

para obter mais imagens a respeito da superfície do conjugado HTCC-AM-AuNPs e de sua composição. As análises foram realizadas pelo técnico Luciano de Oliveira, no LCME.

2.6.5.7 Espectros de emissão de fluorescência

Os espectros de emissão de fluorescência do AM livre em solução aquosa e do conjugado HTCC-AM-AuNPs foram obtidos por espectrofotometria de fluorescência através de um espectrofluorímetro Cary Eclipse da Varian, que usa uma lâmpada de xenônio de 450 W como fonte de excitação. O comprimento de onda de excitação empregado foi de 600 nm, com fendas de excitação e emissão fixadas em 10 nm. A concentração de AM em ambas as amostras é igual a 7×10^{-6} mol L⁻¹.

2.6.6 Rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F)

Os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F) do AM livre em água e etanol e do conjugado HTCC-AM-AuNPs foram calculados a partir de seus espectros de UV-Vis e de emissão de fluorescência, perante a Equação 15, onde A representa a absorção em 600 nm, F é a área sob a curva do espectro de emissão (obtido através de sua integral) e n é o índice de refração do solvente. O subíndice R indica a amostra de referência e o subíndice C indica a amostra analisada. A amostra de referência empregada foi uma solução de AM em etanol, cujo rendimento quântico de emissão de fluorescência é conhecido e reportado na literatura, igual a 0,52 (ϕ_R na Eq. 15).[114] A concentração de AM na amostra de referência (AM em etanol) empregada foi de $9,67 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹, enquanto que nas amostras de AM em água e HTCC-AM-AuNPs a mesma concentração de AM foi utilizada, $[AM] = 5,42 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹.

$$\phi_F = \frac{A_R F_C n_R^2 \phi_R}{A_C F_R n_C^2} \quad (15)$$

Os espectros de absorção de luz UV-Vis e de emissão de fluorescência também foram utilizados para calcular o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$), baseado na Equação 16, onde $\lambda_{\text{abs,max}}$ e $\lambda_{\text{emi,max}}$ são o comprimento de onda máximo de absorção e de emissão, respectivamente.

$$\Delta v = 1 \times 10^7 \left(\frac{1}{\lambda_{abs,max}} - \frac{1}{\lambda_{emi,max}} \right) \quad (16)$$

2.6.7 Análise de lentes térmicas (LT)

As amostras para os transientes de LT foram obtidas pipetando-se 15 μL da solução aquosa estoque de HTCC-AM-AuNPs ($3,1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$), diluídas em 2 mL de água deionizada. A técnica de LT de feixe duplo com incompatibilidade de modo foi usada para estimar o rendimento de calor da amostra HTCC-AM-AuNPs. Nesta técnica, dois feixes de laser Gaussianos TEM_{00} contínuos (laser de argônio a 532 nm) e uma sonda (He-Ne a 632,8 nm) foram empregados para gerar o efeito de lente térmica. Durante a irradiação do laser de excitação, a absorção óptica da amostra gera deposição de calor por processos de decaimento não radiativos. A intensidade do laser da sonda foi fraca o suficiente para evitar um efeito térmico residual nos transientes de LT. O calor localizado altera o índice de refração local, funcionando como uma lente eficaz para o feixe da sonda. O sinal de LT é dado pela Equação 17:[115]

$$I(t) = \left| \int_0^{\infty} \exp[-(1 + iV)g - i\Phi(g,t)] dg \right|^2 \quad (17)$$

em que $\Phi(g,t)$ é a mudança de fase fotoinduzida conforme descrito na Equação 18:

$$\Phi(g,t) = \frac{\theta_{th}}{t_c} \int_0^t \frac{1 - e^{-2mg/(1-2\tau/t_c)}}{(1 - 2\tau/t_c)} d\tau \quad (18)$$

Nas equações 17 e 18, i é a unidade imaginária (ou $i=\sqrt{-1}$), g é uma variável de integração adimensional relacionada a coordenadas radiais por $r = (r/\omega_{1p})^2$, sendo ω_{1p} o raio do feixe da sonda na posição da amostra. O tempo característico térmico $t_c = \omega^2/4D$, sendo ω o raio do feixe de excitação na posição da amostra e D a difusividade térmica. τ é uma variável

de integração com dimensão de tempo, θ_{th} é um fator relacionado a um conjunto de parâmetros físicos proporcionais à amplitude do transiente de LT:

$$\theta_{th} = \frac{P_e \beta L}{k_{th} \lambda_p} \frac{dn}{dT} \phi \quad (19)$$

A amplitude do sinal de LT é relacionado com o coeficiente de rendimento de calor (ϕ), o coeficiente de absorção ótica (β), a condutividade térmica (k_{th}), e com o coeficiente térmico do índice de refração (dn/dT) (Equação 19).[115] Na Equação 19, L é o comprimento do caminho óptico, λ_p é o comprimento da onda do laser da sonda, P_e e ω são a potência e o raio do feixe de excitação do laser e m e V são parâmetros geométricos da configuração.[115]

2.6.8 Ensaio de geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

O ácido úrico (AU) foi aplicado como sonda para avaliar a capacidade do AM livre em água e do conjugado HTCC-AM-AuNPs em gerar EROs, incluindo oxigênio singlete (1O_2). Em uma cubeta de quartzo de 10 mm, 500 μ L de AM (ou de HTCC-AM-AuNPs) ($[AM] = 8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram misturados a 1,5 mL de uma solução aquosa de ácido úrico ($1,05 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). A concentração final de AM e de AU, na cubeta, foi de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ e $8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$, respectivamente. As amostras foram irradiadas continuamente, por um período de tempo pré-determinado, utilizando um laser vermelho (660 nm, 100 mW cm^{-2}), mantido sobre a cubeta durante todo o experimento, com o auxílio de um suporte. Os espectros de absorção UV-Vis foram simultaneamente registrados por um espectrofotômetro Cary 50 da Varian. As cinéticas de degradação do AU foram acompanhadas em 285 e 320 nm, e ajustadas a modelos cinéticos de primeira ordem (Equação 20), ou a modelos de duas etapas consecutivas de primeira ordem (Equação 21).

$$A = A_0 + B e^{-kt} \quad (20)$$

Aqui, A_0 e A representam as absorvâncias no tempo zero e durante a iluminação, respectivamente, B é a amplitude do decaimento da banda de absorção, k é a constante de velocidade e t é o tempo de irradiação.

$$A = A_0 + B_1 e^{-k_1 t} + B_2 e^{-k_2 t} \quad (21)$$

Onde k_1 e k_2 são as constantes de velocidade de fotodegradação do substrato para o primeiro e segundo estágios, respectivamente, e B_1 e B_2 são a amplitude de decaimento da absorção do AU.

As AuNPs livres também foram testadas quanto a possibilidade de geração de EROs, a fim de se verificar possível efeito isolado, com o mesmo laser vermelho (660 nm), e com um laser verde (530 nm, 100 mW cm⁻²).

Adicionalmente, acompanharam-se as cinéticas de fotodegradação do AM em 665 nm, os perfis cinéticos foram ajustados perante Equação 20.

2.6.9 Investigação de produção de EROs e ¹O₂

Para determinar as espécies predominantes geradas por AM livre e HTCC-AM-AuNPs durante iluminação, azida de sódio (NaN₃) e DMSO foram aplicados como agentes supressores de ¹O₂ e EROs, respectivamente.[116] Para o experimento com azida de sódio, em uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, 1,5 mL de solução aquosa de AU (1,05×10⁻⁴ mol L⁻¹) foram misturados a 500 μL de solução aquosa de AM (ou de HTCC-AM-AuNPs), cuja concentração de AM nestas amostras era constante e igual a 7,64×10⁻⁶ mol L⁻¹. Posteriormente, 5 μL de uma solução aquosa de azida de sódio 2 mol L⁻¹ foram adicionados.

Por outro lado, para o experimento com DMSO, uma solução de AU foi preparada com uma solução aquosa contendo 10% de DMSO ([AU] = 1,05×10⁻⁴ mol L⁻¹), e então 1,5 mL desta solução foram pipetados para a cubeta, junto a 500 μL de solução aquosa de AM (ou de HTCC-AM-AuNPs).

Em todos os experimentos, as concentrações finais para o AM e AU foram, respectivamente, 2×10⁻⁶ mol L⁻¹ e 8×10⁻⁵ mol L⁻¹. Uma vez prontas, as amostras foram irradiadas com um laser vermelho (660 nm, 100 mW cm⁻²), e a degradação de ácido úrico foi

acompanhada por espectroscopia de UV-Vis em 295 nm. Os perfis cinéticos foram plotados e a constante de velocidade k das reações foi obtida através das Equações 20 e 21.

Adicionalmente, os espectros de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica (RPE) foram obtidos utilizando um sistema Bruker EMX micro-9.5/2.7/P/L, com cavidade cilíndrica de alta sensibilidade, operando na banda X (9.38 GHz) a 293 K. Os seguintes parâmetros experimentais foram empregados: campo magnético central 3340 G, largura de varredura 100 G, potência de micro-ondas de 5 Mw, amplitude de modulação de 1G, frequência de modulação de 100 kHz, ganho de receptor de 30 dB e número de varreduras igual a 1. Os espectros foram simulados utilizando o software SpinFit (Bruker). As soluções contendo AM (5×10^{-6} mol L⁻¹), AuNPs ($1,7 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) e 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO) (0,1 mol L⁻¹) foram preparadas em um Eppendorf e irradiados por 3 min com um laser vermelho (660 nm, 100 mW cm⁻²), o sistema foi isolado com papel alumínio. As amostras foram imediatamente adicionadas a um tubo de vidro (0,5 mm de diâmetro interno), e as medidas foram registradas após 2 min.

2.6.10 Testes biológicos *in vitro*

2.6.10.1 Ensaio colorimétrico de Sulforodamina B

O ensaio de sulforodamina B (SRB) foi utilizado para determinação da densidade celular, com base na medição do conteúdo de proteína celular. Em síntese, células de câncer de mama MDA-MB231 foram plaqueadas em placas de 96 poços (5000 células/poço). Após um período de 24 h, as células foram pré-incubadas com as seguintes formulações teste, em diferentes concentrações: HTCC-AM-AuNPs, HTCC-AuNPs e AM livre ([AM] = 0,5; 1,0 e 2,5 μmol L⁻¹ e [AuNPs] = $6,75 \times 10^{-10}$; $2,7 \times 10^{-10}$ e $1,35 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹). Após 15 min de incubação, as amostras foram expostas a um sistema de LED *in vitro* – luz branca (“Warm White”, número de série LK1490_M006 – espectro de irradiância na Figura AA a - Anexo A) ($55,3$ J cm⁻² – curva de calibração de irradiância *versus* porcentagem de potência na Figura AA b – Anexo A) por 30 min, utilizando o equipamento em cabine de segurança biológica em temperatura ambiente (25 °C). Os controles foram tratados nas mesmas condições no escuro. Ao término dos 30 min de iluminação, as células foram incubadas por mais 48 h em incubadora

umidificada a 37 °C, e posteriormente fixadas com 100 µL de ácido tricloroacético gelado 10% por 1 h a 4 °C. As placas foram então lavadas cinco vezes com água fria e deixadas secar durante a noite. Uma solução de SRB (0,057% de SRB em 1% de ácido acético) e secas ao ar durante a noite. Em seguida, 100 µL de Tris base 10 mM (pH 10,5) foram adicionados para solubilizar o corante. As placas foram agitadas suavemente durante 20 min e a absorvância foi lida a 510 nm em um leitor de microplacas. A densidade celular foi calculada como a percentagem de absorvância (% de células) em comparação com a absorvância de controles não tratados.[117]

RESULTADOS E DISCUSSÃO

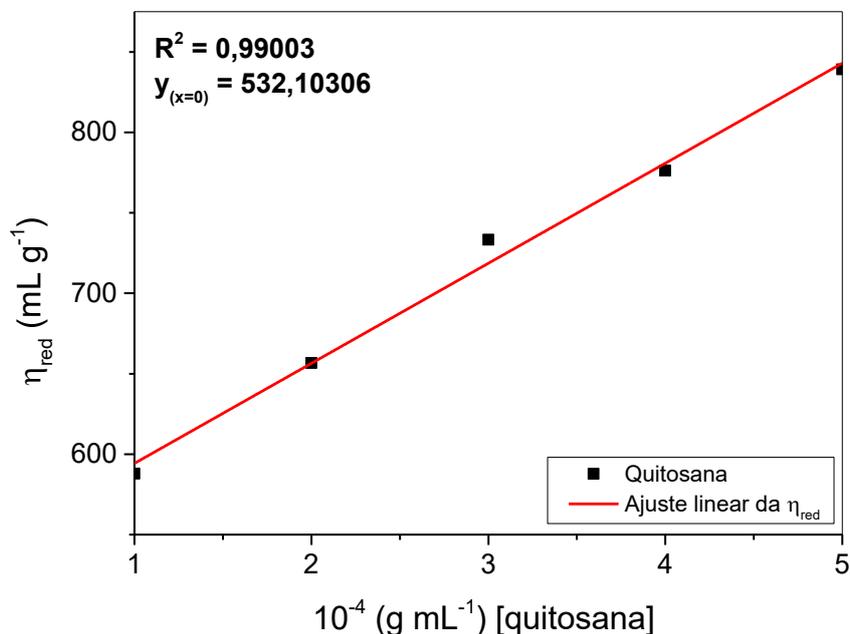
2.7.1 Caracterização da quitosana e do derivado catiônico cloreto de n-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC)

2.7

A primeira etapa experimental consistiu na caracterização completa do material de partida – a quitosana, que foi utilizada na síntese do derivado quaternário (catiônico) cloreto de *N*-(2-hidroxi)propil-3-trimetilamônio quitosana (HTCC). O HTCC foi sintetizado com o objetivo de aumentar a solubilidade da quitosana em uma ampla faixa de pH[118], facilitando sua aplicação na síntese do conjugado. Além disso, o HTCC mantém as excelentes propriedades biológicas da quitosana, tais como alta biocompatibilidade e baixa toxicidade.[119], [120]

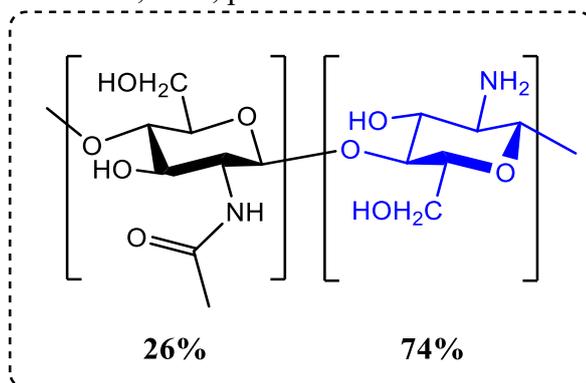
O método da viscosidade intrínseca $[\eta]$ foi utilizado para determinar a massa molar viscosimétrica média (\bar{M}_V) da quitosana. Os dados obtidos de viscosidade absoluta (η), viscosidade relativa (η_{rel}), viscosidade específica (η_{esp}) e viscosidade reduzida (η_{red}) estão listados na Tabela A1 do Apêndice A. A partir destes dados, plotou-se um gráfico de η_{red} em função da concentração de quitosana (Figura 14), em que o intercepto é o valor correspondente de $[\eta]$, resultando em um valor igual a $532,1 \text{ mL g}^{-1}$, dado utilizado para calcular a \bar{M}_V a partir da Equação 5 (Equação de Mark-Kuhn-Houwink-Sakurada). Para a quitosana, a \bar{M}_V encontrada foi de 114.677 Da (ou 114,7 kDa). Este valor de massa molar, determinado experimentalmente, corrobora com as informações fornecidas pelo fabricante na embalagem do produto, estando dentro da faixa de 50.000 – 190.000 Da, caracterizando-a como uma quitosana de baixa massa molar.

Figura 14 – Viscosidade reduzida (η_{red} , mL g⁻¹) em função da concentração de quitosana (g mL⁻¹) com os dados experimentais listados na Tabela A1 (Apêndice A). O intercepto representa a $[\eta]$, 532,103 mL g⁻¹ para a quitosana, cujo valor foi utilizado para a obtenção de sua massa molar viscosimétrica \bar{M}_V .



Para elucidação estrutural da quitosana, foi determinado o seu Grau de Desacetilação (GD). A primeira técnica empregada para o cálculo do GD da quitosana foi a RMN de ¹H (Figura 16a, pg 63), o GD_{RMN} foi calculado a partir de Equação 6 e o valor de 79% foi encontrado. Adicionalmente, o espectro de infravermelho da quitosana (Figura B 1 – Apêndice B) também foi empregado para calcular seu GD (GD_{FT-IR}), pela Equação 7, cujas áreas das bandas em 1324 cm⁻¹ (monômero acetilado) e 1424 cm⁻¹ (monômero desacetilado) estão representadas na Figura B 2 (Apêndice B), resultando um GD_{FT-IR} de 78,8%. Por fim, o GD_{TP} foi obtido da Equação 8, baseado na titulação potenciométrica da quitosana (Figura 19a, pg 68), resultando 65%. O GD médio da quitosana foi considerado então, como 74%. O GD obtido é coerente com o informado pelo fornecedor, e indica que 26% da quitosana é composta por monômeros acetilados (Figura 15).

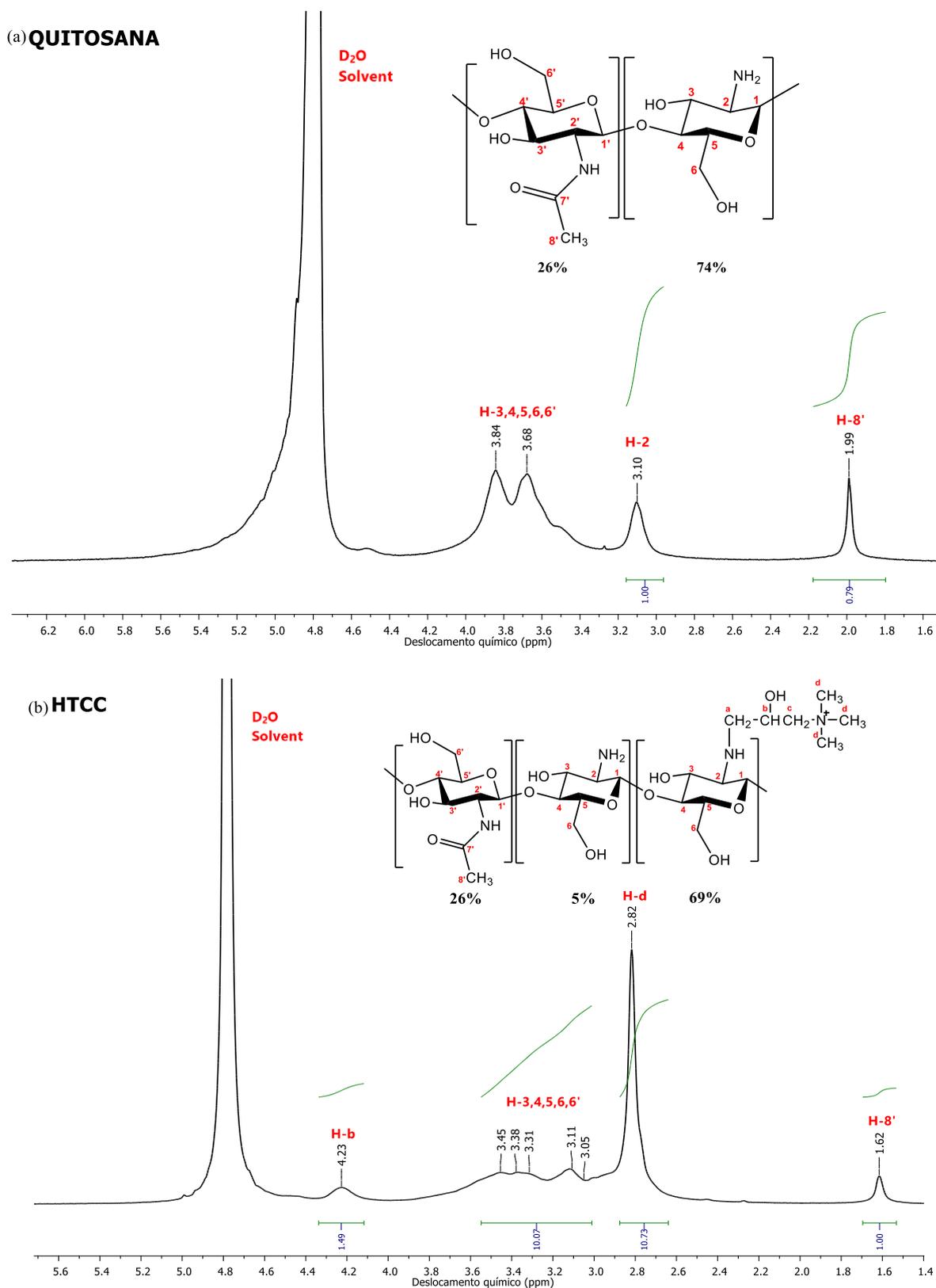
Figura 15 – Estrutura geral do biopolímero quitosana, cuja cadeia é composta em 26% por monômeros acetilados e o restante, 74%, por monômeros desacetilados.



A quaternização da quitosana e a formação do derivado catiônico HTCC foi confirmada por RMN de ¹H (Figura 16). O espectro de RMN de ¹H da quitosana (Figura 16a) foi utilizado para confirmar que a modificação química foi bem sucedida. Ele apresentou os sinais característicos do polissacarídeo, em δ 1,99 ppm, referente aos prótons metílicos dos grupos acetamida (H-8', monômero acetilado); em δ 3,10 ppm referente ao próton do carbono-2 do monômero desacetilado (H-2); e em δ 3,68 a 3,84 ppm (H-3,4,5,6 e 6'). O sinal referente aos H-1,1' não pode ser visto, pois seu deslocamento químico (δ) esperado (em torno de 4,87 ppm) coincide com o do solvente (D₂O), estando sobrepostos ao sinal deste.[121], [122]

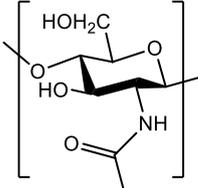
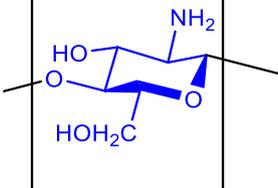
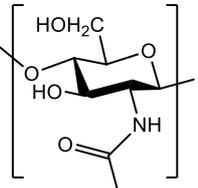
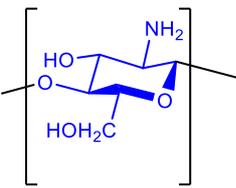
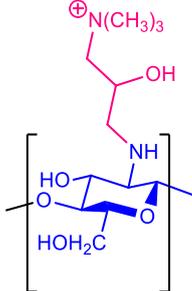
O espectro obtido para o HTCC (Figura 16b) é muito similar ao da quitosana, entretanto, pode-se destacar o aparecimento dos sinais em δ 2,82 e 4,23 ppm. De acordo com os resultados obtidos por Xiao e colaboradores (2012), que sintetizaram e caracterizaram o HTCC, o sinal em δ 2,82 ppm indica a presença dos prótons dos grupos metílicos do sal de amônio quaternário (H-d), e o sinal em δ 4,23 ppm está relacionado ao próton metínico (Hb) também proveniente do ligante quaternário.[123] Os sinais que aparecem entre 3-4 ppm são o resultado de múltiplos sinais de ¹H que encontram-se sobrepostos e são derivados dos hidrogênios dos carbonos C-3 a C-6. A partir das integrais de cada sinal, foi possível determinar o grau de substituição (GS) do HTCC, através das Equações 10 e 11, e um GS de 69% foi encontrado. Considerando que a quantidade de unidades acetiladas não reage (26%), a quantidade remanescente de unidades desacetiladas no HTCC é de 5%.

Figura 16 – Espectros de RMN ^1H 400 MHz da quitosana (a) e do derivado catiônico HTCC (b), em D_2O . Os sinais são destacados e relacionados aos respectivos hidrogênios que puderam ser identificados.



A análise elementar (Tabela 1) obtida para o HTCC e para a quitosana mostrou que os percentuais em massa obtidos experimentalmente, para C, N e H são consistentes com aqueles teoricamente calculados, apresentando deslocamentos negativos para C e N, e positivo para H, que pode estar relacionado a presença de água nas amostras. Além disso, a proporção entre o percentual de C e N encontrada nos cálculos teórico e experimental é muito próxima, apresentando discrepância inferior a 1,5% para quitosana e 2,5% para o HTCC, reforçando a coerência das proporções monoméricas apresentadas.

Tabela 1 – Comparação entre os percentuais de C, H e N presentes nas amostras de (a) quitosana e (b) HTCC, calculados teoricamente e determinados experimentalmente através de análise elementar.

		Quitosana			
(a)			Total calculado (%)	Total experimental (%)	
	26 %	74 %			
C (%)	47,29	44,72	45,39	42,01	
H (%)	6,45	6,88	6,77	7,10	
N (%)	6,89	8,69	8,22	7,50	
C/N	-	-	5,52	5,60	
		HTCC			
(b)				Total calculado (%)	Total experimenta l (%)
	26 %	5 %	69 %		
C (%)	47,29	44,72	51,97	50,39	41,42
H (%)	6,45	6,88	9,09	8,29	8,42
N (%)	6,89	8,69	10,1	9,19	7,37
C/N	-	-	-	5,48	5,62

Os espectros de infravermelho da quitosana e do HTCC são mostrados na Figura 17. A intensa banda que aparece na região entre 3500-3300 cm^{-1} se refere à vibração axial das ligações N-H e O-H presentes nos polissacarídeos. Na quitosana, esta banda é mais intensa (vide Figura 17a) porque está também relacionada às ligações de hidrogênio inter- e intramoleculares deste polímero. Os grupos alquil de ambos os polímeros apresentam picos de absorção em 2925 e 2869 cm^{-1} , relacionados ao estiramento simétrico a assimétrico das ligações C-H, respectivamente. O estiramento do grupo C=O da amida I pode ser observado pela banda em 1654 cm^{-1} , enquanto a vibração angular da ligação N-H da amida II se encontra em 1595 cm^{-1} , ambos derivados dos grupos N-acetilados. A banda em 1320 cm^{-1} se deve ao estiramento C-N da amida II dos monômeros N-acetilados. Em 1590 cm^{-1} encontra-se uma banda que pode ser atribuída à vibração angular da ligação N-H das aminas primárias.[124] As bandas em 1420 e 1380 cm^{-1} foram relacionadas a vibração angular dos grupos CH_2 e deformações simétricas dos grupos CH_3 , respectivamente. A banda em 1154 cm^{-1} corresponde ao estiramento assimétrico da ponte C-O-C, característicos da estrutura sacarídica, e as bandas em 1077 e 1034 podem ser atribuídas ao estiramento C-O. Em comparação com o espectro da quitosana, algumas mudanças foram observadas no espectro do HTCC, como o aparecimento de uma banda sutil em 1482 cm^{-1} , relacionada com modos vibracionais angulares assimétricos dos grupos metil (ligações C-H dos grupos trimetilamônio) do sal de amônio quaternário.[123], [125], [126] Ocorreu, ainda, um aumento da intensidade da banda em 2924 cm^{-1} devido a vibrações C-H simétricas. Para uma melhor visualização das bandas HTCC evidenciadas, consulte a ampliação da região de interesse (Figura B 3 – Apêndice B). Com base nos espectros de RMN ^1H e FT-IR, pode-se dizer que a síntese do HTCC se procedeu com sucesso. Por fim, a proporção entre as unidades monoméricas do HTCC ficou definida em: 26% de monômeros acetilados, 69% de monômeros quaternizados, e 5% de monômeros desacetilados, assim como ilustra a Figura 18.

Figura 17 – Espectros de infravermelho da quitosana (a) e do derivado catiônico HTCC (b).

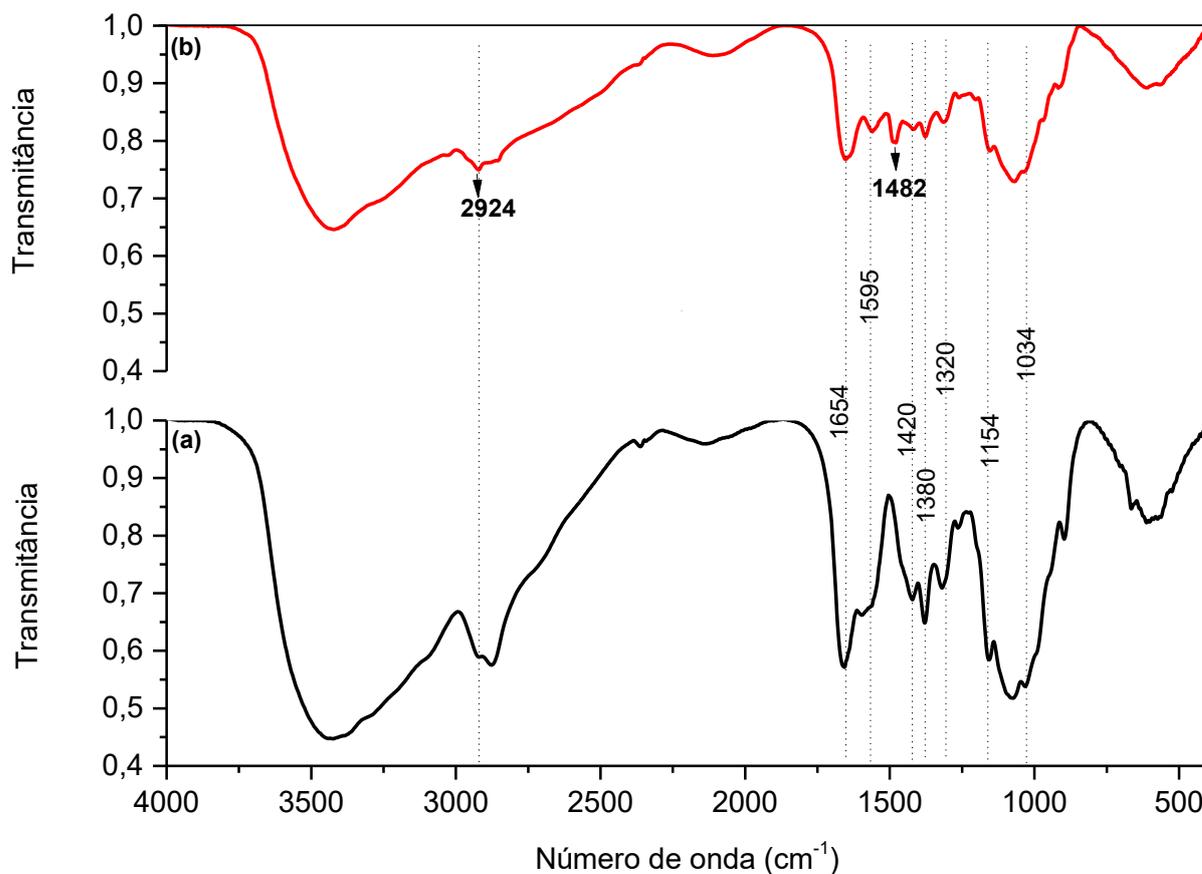
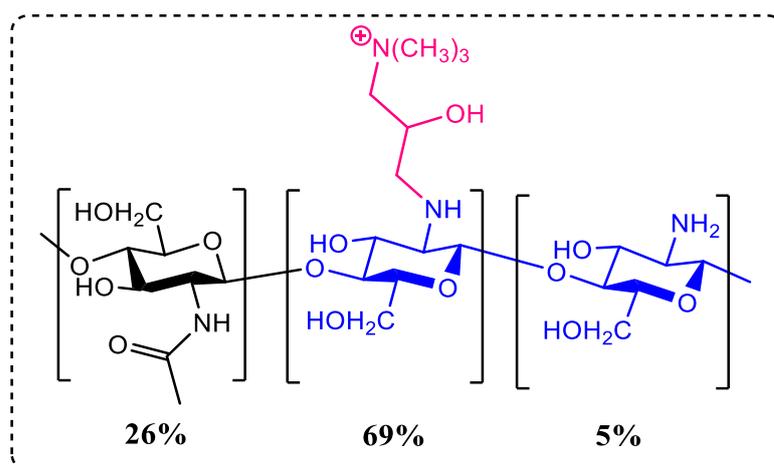


Figura 18 – Estrutura geral do HTCC, polímero catiônico obtido a partir da reação de quaternização da quitosana, composto em 26% por monômeros acetilados, 5% por desacetilados e 69% por monômeros quaternizados.



Para complementar a caracterização dos polímeros, foram realizadas as titulações potenciométricas. A titulação do HTCC (Figura 19b) mostrou um perfil distinto da quitosana (Figura 19a), apresentando dois pK_a s em 6,1 e 10,2. O pK_a de 6,1, equivalente ao pK_a da quitosana, foi atribuído ao grupo $-NH_2$, enquanto o pK_a de 10,2 foi relacionado à amina secundária NHR.

O pK_a de 6,1 da quitosana é reportado na literatura e difere do valor esperado para o pK_a de aminas (entre 10 e 11).[127] Para obter maiores informações a respeito desta condição, as análises de difração de raios-X foram efetuadas. O padrão de difração de raios X da quitosana (Figura 20) mostrou um pico em $2\theta = 20,0^\circ$, indicando estrutura cristalina estabilizada por ligações intramoleculares e intermoleculares de hidrogênio, que diminuem a solubilidade da quitosana acima de pH 6.[128], [129], [130], [131] A presença destas ligações de hidrogênio torna os elétrons não ligantes dos grupos amino menos disponíveis, diminuindo a basicidade dos mesmos, que encontram-se protonados apenas em pHs ligeiramente ácidos. Após a funcionalização da quitosana e formação do derivado HTCC, com o impedimento estérico causado pela inserção do grupo substituinte, a formação da estrutura cristalina é dificultada (Figura 20), o que possibilita a dissolução em pH neutro, e o pK_a observado de 10,2 é consistente com o esperado para aminas secundárias.[132]

Figura 19 – Titulações potenciométricas. (a) Quitosana, $1,1 \text{ g L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, V_1 , V_2 e pK_a destacados; (b) HTCC, $2,0 \text{ g L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$, pK_{a1} e pK_{a2} destacados.

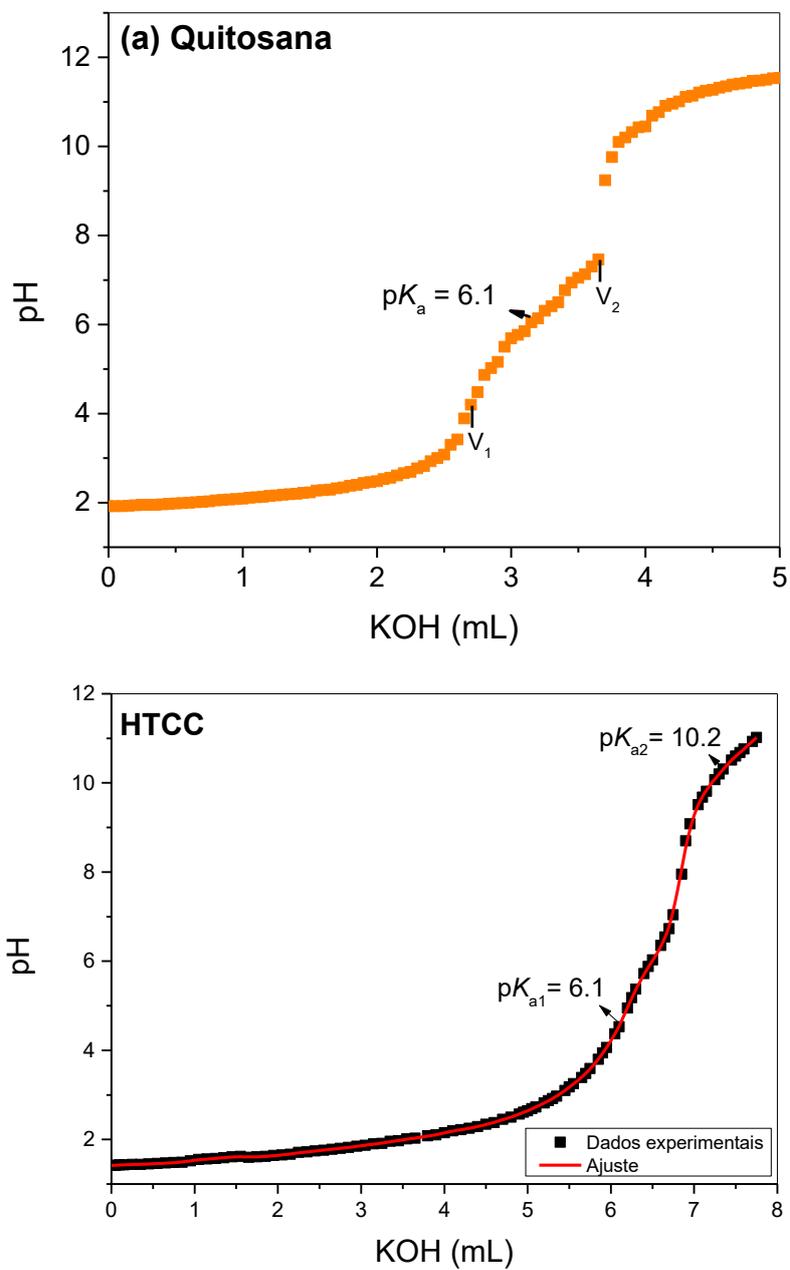
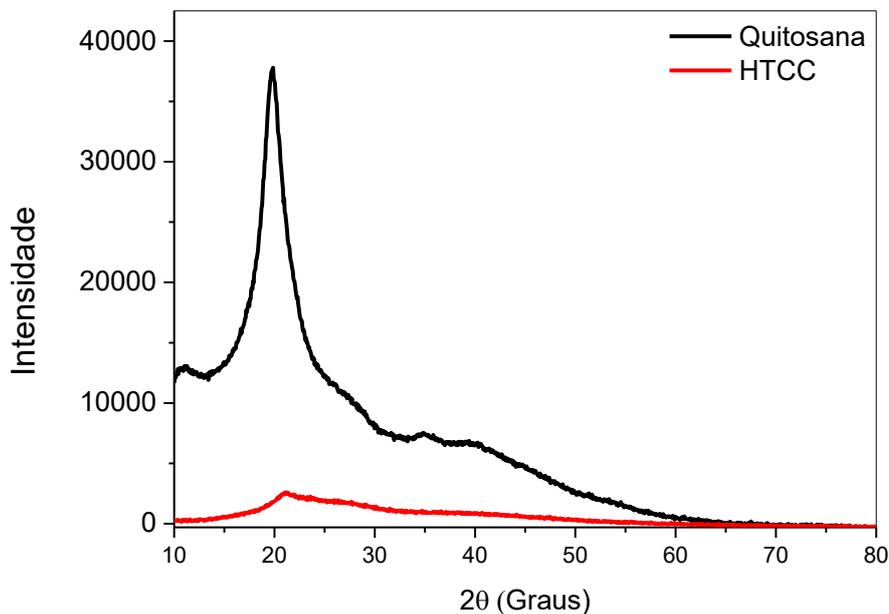


Figura 20 – Padrões de difração de raios X da quitosana pura e da quitosana quaternizada (HTCC).



2.7.2 Caracterização das AuNPs e do conjugado HTCC-AM-AuNPs

As nanopartículas de ouro recobertas com citrato (AuNPs) foram sintetizadas com o intuito de funcionarem como a base para montagem do sistema de entrega AM. O preparo das AuNPs seguiu o conhecido método de Turkevich[111], empregando ácido cloroáurico (HAuCl_4) como precursor dos íons Au^{3+} e citrato de sódio (NaCt) como agente redutor e estabilizante da nanopartícula. De acordo com Turkevich (1985, p. 86): “a redução do ácido cloroáurico pelo citrato de sódio a 100 °C produziu uma solução coloidal [...] que apresentava excelente estabilidade e tamanho de partícula uniforme de 20 nm de diâmetro.”[111]

A solução contendo as AuNPs apresentou coloração avermelhada (vide inserto na Figura 21a), resultante do efeito de Ressonância de Plasmon de Superfície, com absorção de luz na região do verde do espectro eletromagnético. O espectro de absorção das AuNPs mostrou o perfil característico deste tipo de material, apresentando forte absorção na região do visível com comprimento de onda máximo de absorção (λ_{max}) em 530 nm (Figura 21a).[133]. O comprimento de onda máximo de absorção das AuNPs tem relação direta com seu tamanho, e bandas de absorção na região de 520 a 530 nm indicam a formação de nanopartículas com tamanhos que variam entre 30 a 40 nm.[134] Além disso, a razão molar $\text{HAuCl}_4:\text{NaCt}$ (1:2)

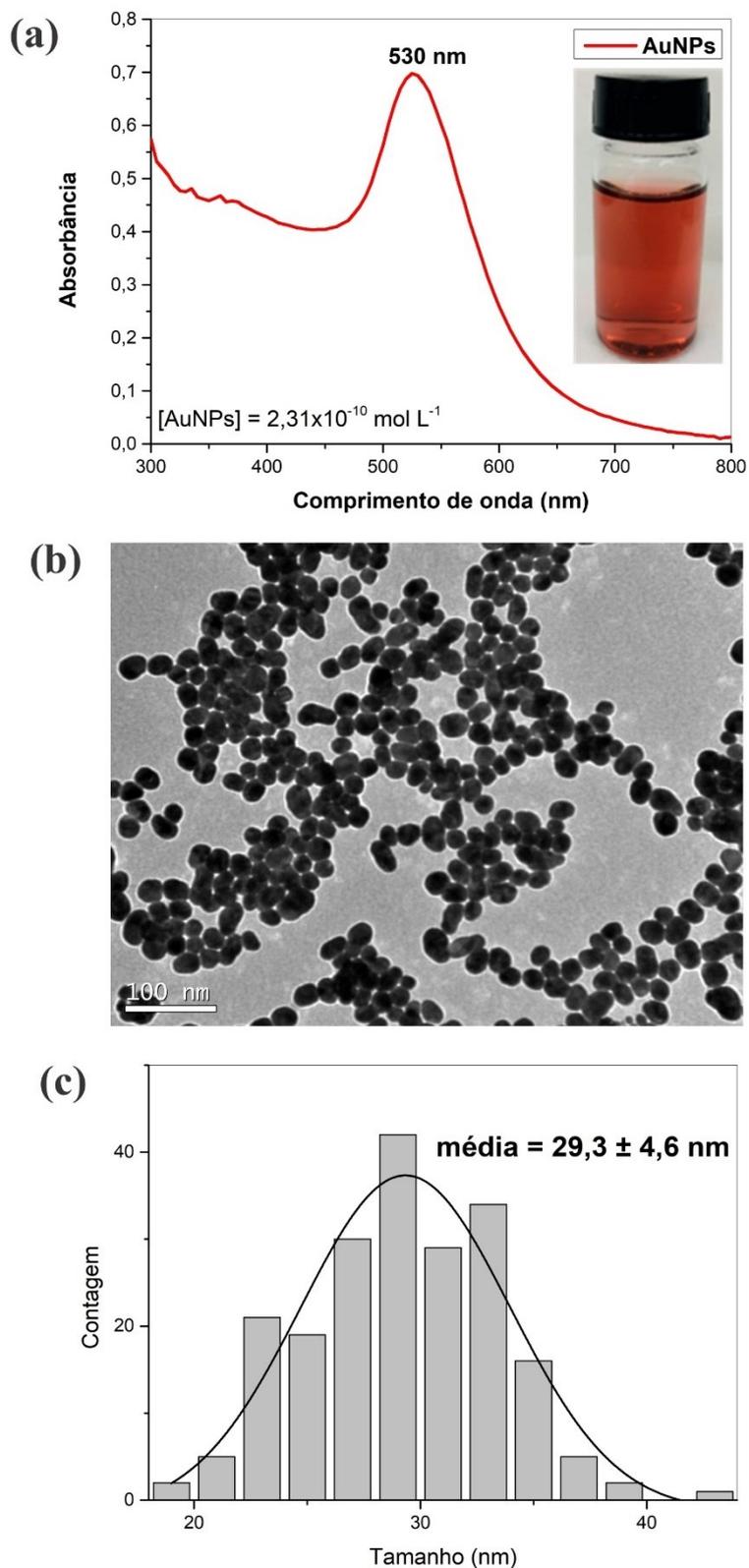
empregada na síntese foi baseada no estudo de Dong e colaboradores (2019), que reportaram a obtenção de AuNPs de aproximadamente 50 nm ao empregar a razão molar mencionada.[135], [136]

Na sequência, medidas de espalhamento dinâmico de luz permitiram determinar o tamanho hidrodinâmico médio das AuNPs, resultando em 47,6 nm. O tamanho também foi analisado através de medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET). As imagens de MET revelaram que as AuNPs possuem formato esférico (Figura 21b). Um histograma de distribuição de tamanhos (Figura 21c) foi construído, medindo-se o tamanho de cada uma das nanopartículas contidas na Figura 21b, com auxílio do software ImageJ, e um tamanho médio de $29,3 \pm 4,6$ nm foi determinado. O valor obtido de tamanho hidrodinâmico é superior devido a presença da camada orgânica externa de grupos citrato envolvendo as AuNPs (não visível nas imagens de MET), além da camada de solvatação. O tamanho das AuNPs sintetizadas apresentou-se em acordo com o referencial teórico citado para a faixa de absorção máxima de 530 nm.

As medidas de potencial Zeta mostraram que as AuNPs possuem carga superficial negativa, em torno de -24,4 mV, atribuída a presença dos grupos carboxilato das moléculas de citrato em sua superfície, possuindo forte caráter aniônico.[137] O coeficiente de absorção molar das AuNPs, ϵ_{AuNPs} , foi determinado como $2,96 \times 10^9$ L mol⁻¹ cm⁻¹ a 530 nm (consulte Figura C 1, Apêndice C), e está em acordo com os valores encontrados na literatura para AuNPs recobertas com citrato de tamanho próximo.[113]

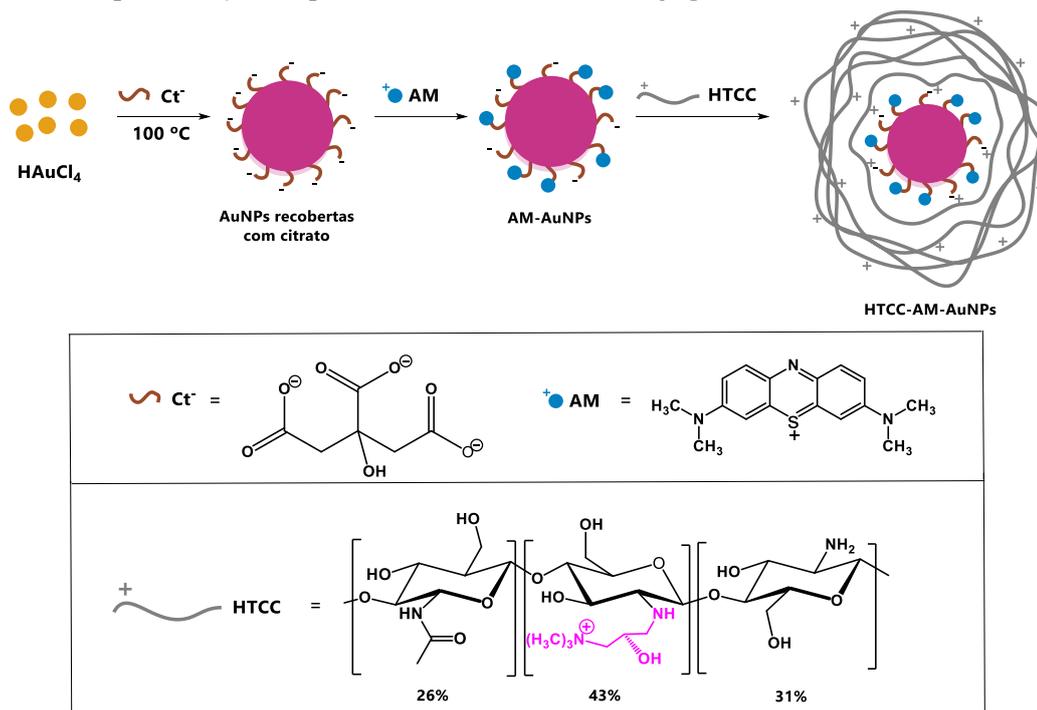
Conforme mencionado, os grupos citrato negativamente carregados presentes na superfície das nanopartículas podem ser utilizados para funcionalização das AuNPs com moléculas catiônicas, através de interações eletrostáticas, conforme já reportado em diversos trabalhos.[138], [139] Neste trabalho, as interações eletrostáticas foram empregadas como força motriz para a incorporação do FS azul de metileno (AM) e do polímero HTCC, ambas espécies catiônicas, à superfície das AuNPs, levando a formação do conjugado HTCC-AM-AuNPs.

Figura 21 – (a) Espectro de UV-Vis das AuNPs ($2,31 \times 10^{-10}$ mol L⁻¹) – inserto: coloração avermelhada da solução aquosa de AuNPs; (b) imagens de MET 100 kV das AuNPs, escala de 100 nm; (c) histograma de distribuição de tamanhos usado para determinar o tamanho médio das AuNPs.



Para a obtenção do conjugado HTCC-AM-AuNPs, a superfície das AuNPs foi eletrostaticamente funcionalizada primeiramente com o FS AM, e logo após com HTCC, assim como mostra o passo a passo da Figura 22. O HTCC não possui atividade em terapias fotoativadas, tendo sido inserido no conjugado com o objetivo da formação de uma camada polimérica de recobrimento da partícula e proteção contra a redução do AM.

Figura 22 – Representação esquemática da síntese do conjugado HTCC-AM-AuNPs.



Os conjugados de HTCC-AM-AuNPs foram caracterizados quanto ao seu espectro de absorção UV-Vis, e comparado aos perfis de absorção das AuNPs livres, do AM livre, e das AuNPs na presença de HTCC (HTCC-AuNPs), assim como mostra a Figura 23a. A banda em 530 nm, característica das AuNPs, pode ser observada tanto no conjugado HTCC-AM-AuNPs, quanto no controle HTCC-AuNPs, não apresentando deslocamento de seu λ_{max} de absorção. Além disso, a banda de AM em 665 nm foi observada no espectro do conjugado, indicando que a funcionalização da superfície das AuNPs com o FS AM foi realizada com sucesso. Não foi possível obter o produto intermediário da síntese do conjugado, AM-AuNPs, que seria investigado também como grupo controle, uma vez que, após centrifugação, não se apresentou

solúvel em água. O coeficiente de absorção molar do conjugado ($\epsilon_{\text{HTCC-AM-AuNPs}}$), determinado por regressão linear (Figura D 1 – Apêndice D), é de $2,62 \times 10^9 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

O tamanho hidrodinâmico obtido para o conjugado HTCC-AM-AuNPs foi de 150,4 nm, significativamente maior que o tamanho obtido previamente para as AuNPs livres (47,6 nm). Este aumento de tamanho pode ser relacionado à funcionalização da superfície da nanopartícula com AM, somado ao recobrimento com as cadeias poliméricas de HTCC, dado que corrobora para confirmação da formação do conjugado. Além disso, o Potencial Zeta sofreu uma modificação de -24,4 mV (AuNPs livres) para +26,6 mV no HTCC-AM-AuNPs, comprovando que as nanopartículas foram recobertas com o polímero catiônico. Para um maior detalhamento com relação a morfologia do conjugado, imagens de MET e MEV foram obtidas. Apesar da tentativa de marcação do material orgânico que recobre as nanopartículas no conjugado, com o marcador uranil, não foi possível observar a camada polimérica nas imagens de MET, sendo possível apenas observar o material inorgânico contido no grid – ou seja, as AuNPs (Figura 23b). Desta forma, não foi possível fazer as leituras de tamanho por MET e construção de histograma para o conjugado. Por outro lado, na imagem de MEV (Figura 23c) é possível identificar a camada polimérica externa, representada por um sombreado cinza claro que envolve as nanopartículas. Ambas as imagens revelam morfologia esférica do sistema. Com a finalidade de obter-se mais dados para comprovar a presença do HTCC na superfície do conjugado, realizou-se uma análise de composição elemental a partir de MEV com pistola de emissão de campo, onde obteve-se um espectro de energia dispersiva de elétrons (Figura 24). No espectro, o pico de maior intensidade que aparece sem indicação, em aproximadamente 1,9 keV, se refere ao silício (Si), elemento constituinte da placa sobre a qual é suportada a amostra, o pico é desconsiderado para que não interfira na contagem percentual dos elementos que compõe a amostra. A análise revelou picos que indicam a presença dos seguintes átomos no conjugado HTCC-AM-AuNPs: ouro (Au – $86,21 \pm 1,12\%$); carbono (C – $5,66 \pm 0,47\%$); oxigênio (O – $6,18 \pm 0,44\%$) e nitrogênio (N – $1,95 \pm 1,02\%$) (Tabela 2). Os resultados indicam que o conjugado é composto majoritariamente por átomos de ouro, associados às AuNPs, enquanto os átomos de C e O podem ser associados tanto ao citrato quanto ao HTCC. O diferencial desta análise foi o indicativo da presença de N, uma vez que o único componente do conjugado que apresenta átomos de N em sua composição é o HTCC, reforçando então, a presença do polímero na amostra.

Figura 23 – (a) Espectros de absorção do HTCC-AM-AuNPs, $[AuNPs] = 3.5 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$; $[MB] = 7.4 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a imagem inserida mostra a coloração do conjugado em solução aquosa. (b) Imagem de MET (escala 100 nm) e (c) Imagem de MEV do HTCC-AM-AuNPs, as setas vermelhas indicam a camada polimérica de HTCC recobrindo a partícula.

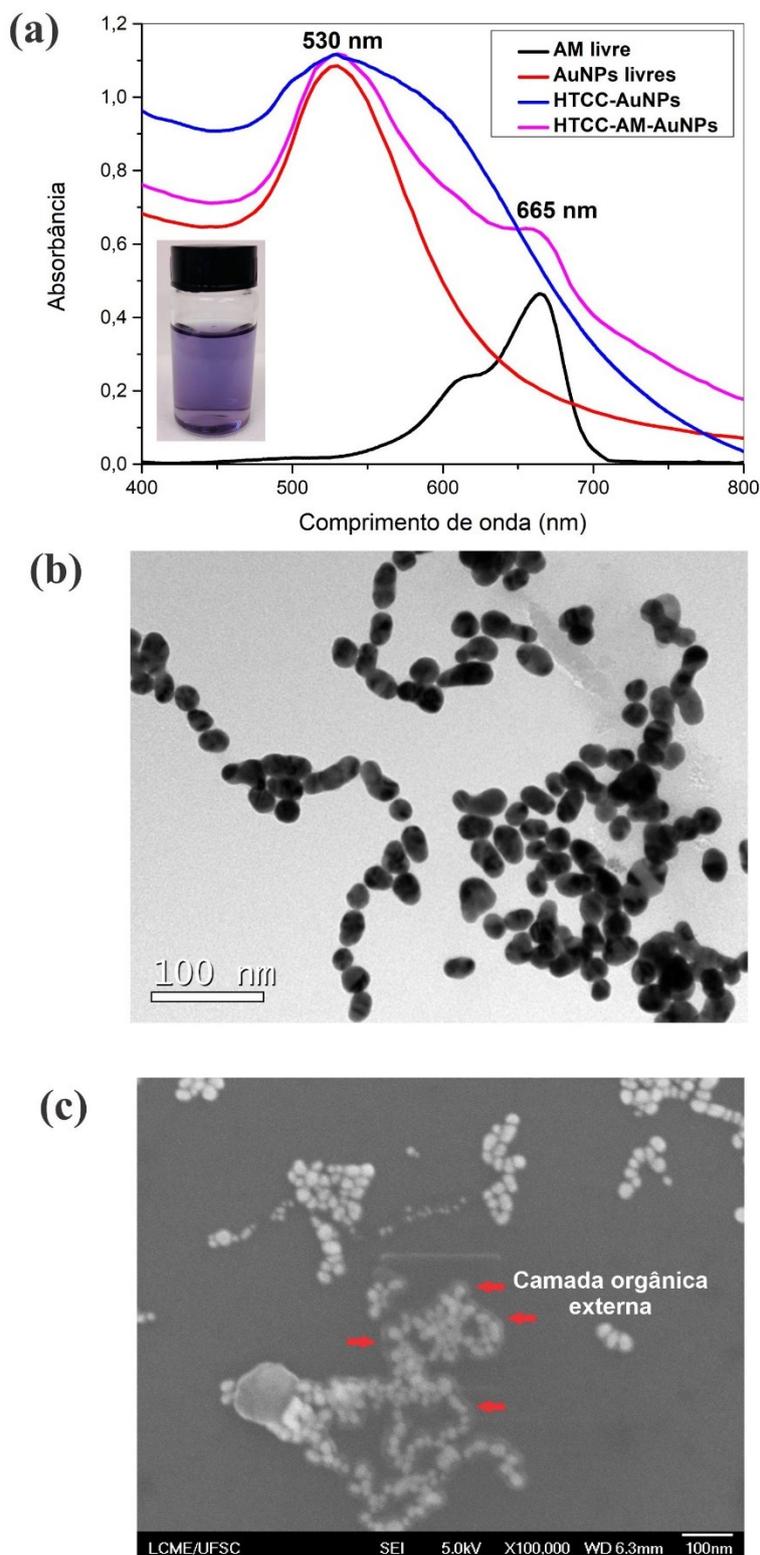


Figura 24 – Espectro de energia dispersiva com os resultados percentuais (%), em massa, dos elementos constituintes da amostra HTCC-AM-AuNPs. Voltagem de aceleração de 15,0 kV, magnificação de 20000.

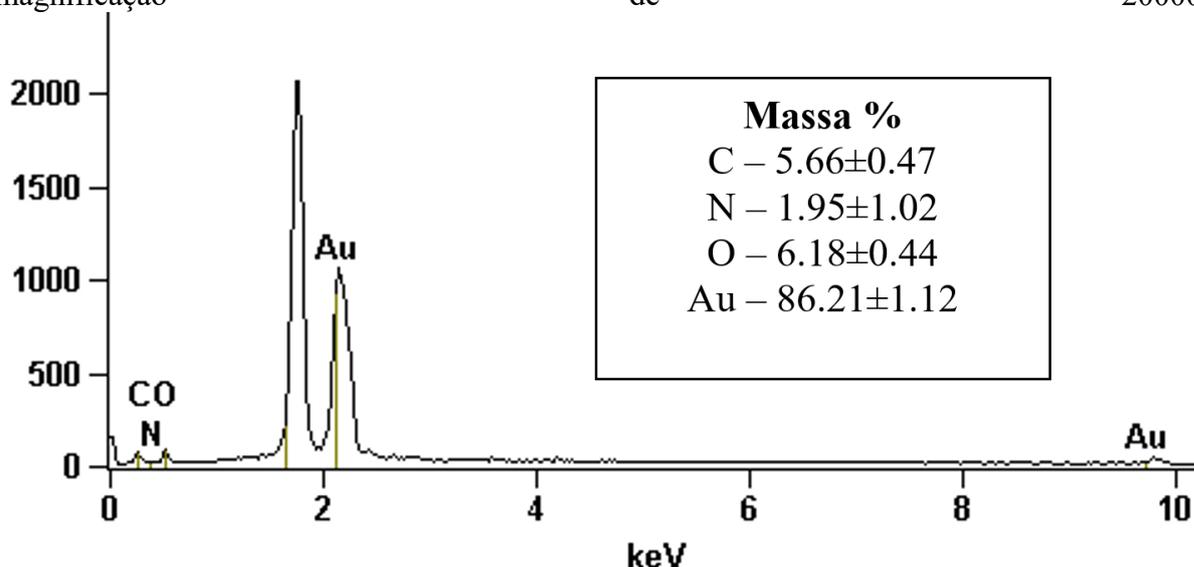


Tabela 2 – Resultados, em percentual de massa e átomos, com erro relativo, dos elementos constituintes da amostra HTCC-AM-AuNPs, obtidos através de análise de energia dispersiva de elétrons.

	Percentual, em massa (%)			
	<i>C-K</i>	<i>N-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Au-M</i>
<i>HTCC-AM-AuNPs</i>	5,66	1,95	6,18	86,21
	Erro (%) (±)			
<i>HTCC-AM-AuNPs</i>	±0,47	±1,02	±0,44	±1,12
	Percentual, em átomos (%)			
	<i>C-K</i>	<i>N-K</i>	<i>O-K</i>	<i>Au-M</i>
<i>HTCC-AM-AuNPs</i>	32,85	9,72	26,93	30,51
	Erro (%) (±)			
<i>HTCC-AM-AuNPs</i>	±2,72	±5,10	±1,94	±0,40

Além das caracterizações supracitadas, as propriedades fotofísicas do AM livre e conjugado ao HTCC-AM-AuNPs foram analisadas, a partir de seus espectros de emissão de fluorescência. Como pode-se observar na Figura 25a, ao ser incorporado no conjugado, o AM apresenta uma intensa redução de sua emissão de fluorescência, em relação a sua forma livre (AM livre em água e em etanol). Os comprimentos de onda máximos de absorção ($\lambda_{\text{abs,max}}$) e de emissão ($\lambda_{\text{emi,max}}$) foram utilizados para calcular o deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$), através da Equação 16, e os resultados estão dispostos na Tabela 3. Um pequeno $\Delta\nu$ foi observado para o

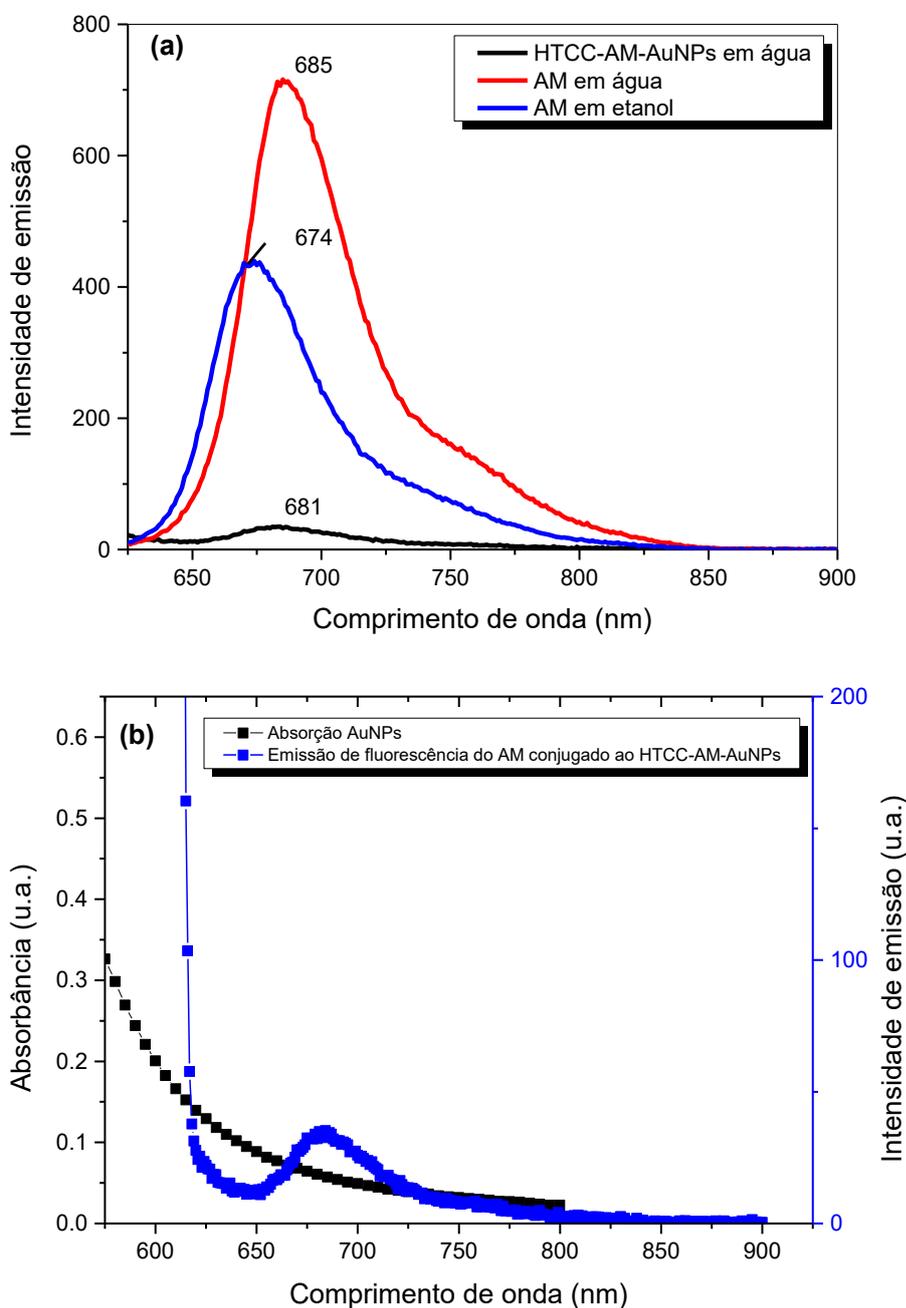
HTCC-AM-AuNPs em relação ao AM livre, e isto pode ser associado ao microambiente diferente em que o AM se encontra quando incorporado às nanopartículas, estando recoberto por cadeias poliméricas.

A partir dos espectros de luz visível e de emissão também foi possível determinar os rendimentos quânticos de fluorescência (ϕ_F). É interessante salientar que os cálculos foram realizados através da Equação 15 e o valor de ϕ_F de referência empregado é o do AM em etanol (0,52). Para o AM livre em água, o ϕ_F encontrado foi de 0,27, enquanto o AM incorporado ao conjugado HTCC-AM-AuNPs apresentou ϕ_F abaixo de 0,01. Em parte, esta brusca redução pode estar associada à reabsorção interna de luz pelas AuNPs (Figura 25b), ou seja, uma parte da luz incidente emitida pela fonte no momento da excitação estaria sendo absorvida pelas nanopartículas. Além disso, uma vez que o AM foi conjugado às AuNPs, mudanças nos caminhos de desativação do estado excitado podem ser consideradas, como a redução das transições $S_1 \rightarrow S_0$ por emissão de fluorescência. A redução de um processo de desativação pode levar ao favorecimento de outro(s), como, por exemplo, o cruzamento intersitema, que favorece as reações no estado tripleto, desejável para aplicações fotodinâmicas.

Tabela 3 – Deslocamentos de Stokes ($\Delta\nu$, cm^{-1}) para o AM livre em etanol e em água e para o AM conjugado ao HTCC-AM-AuNPs.

Amostra	Solvente	$\lambda_{\text{abs,max}}$	$\lambda_{\text{emi,max}}$	$\Delta\nu$ (cm^{-1})
<i>AM</i>	Etanol	655	674	430,4
	Água	665	685	439,0
<i>HTCC-AM-AuNPs</i>	Água	665	681	353,3

Figura 25 - (a) Espectros de emissão de fluorescência do AM livre em etanol e em água, e do AM conjugado ao HTCC-AM-AuNPs, a 25 °C, comprimento de onda de excitação (λ_{exc}) de 600 nm, fenda 10 nm, [AM] em etanol = $9,67 \times 10^{-7}$ mol L⁻¹; [AM] em água e no HTCC-AM-AuNPs = $5,42 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹. (b) Comparação entre a absorção visível das AuNPs e a emissão de fluorescência do AM no conjugado HTCC-AM-AuNPs.

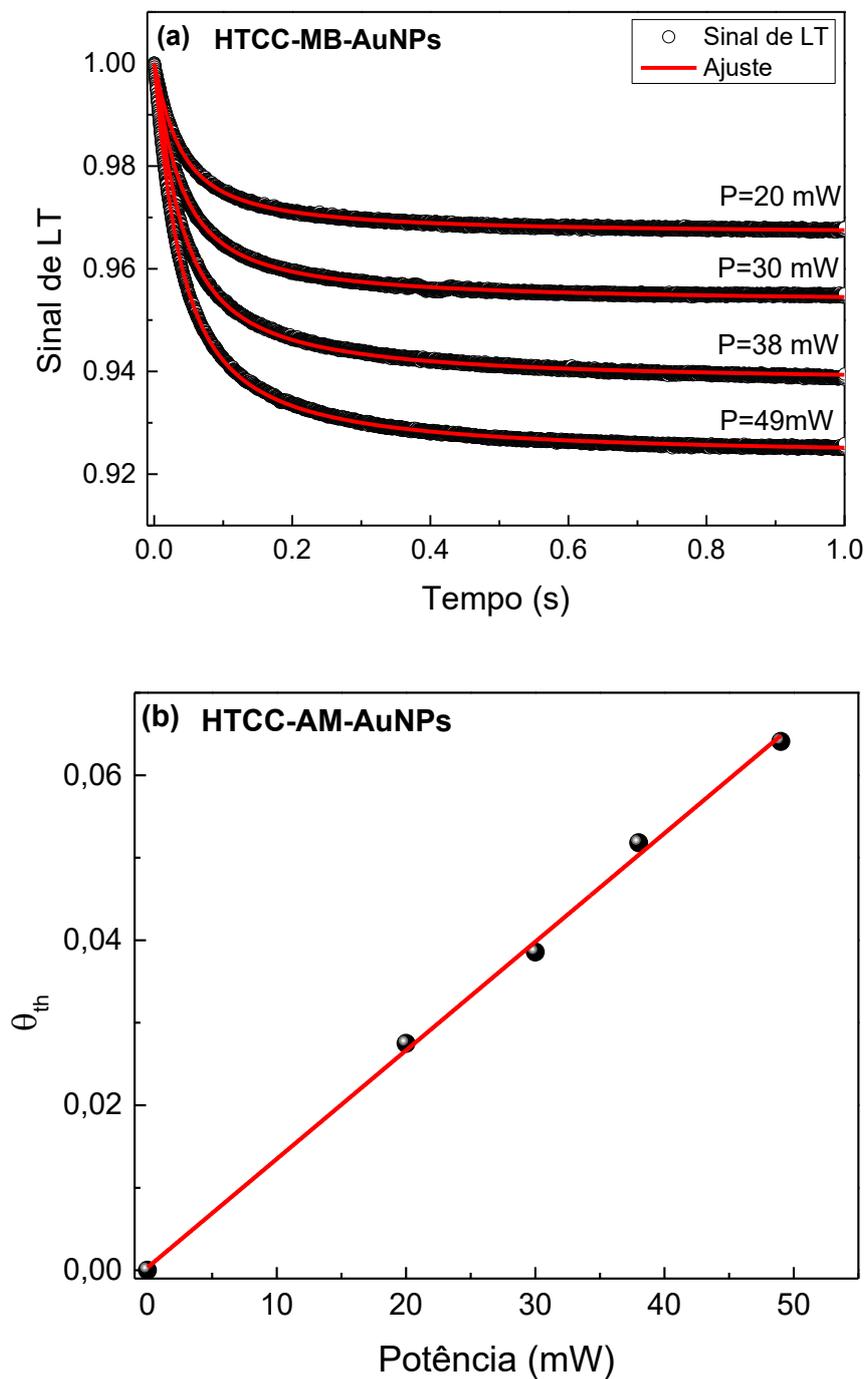


2.7.3 Análise de lente térmica (LT)

As AuNPs foram aplicadas na construção do conjugado HTCC-AM-AuNPs para além de servirem como base para o carregamento de AM, uma vez que o efeito de Ressonância de Plasmon de Superfície Localizado (RPSL) - único das nanopartículas metálicas - pode ser aproveitado para promover a elevação da temperatura de seu ambiente local, na medida em que sua superfície é atingida por radiação absorvível, possibilitando sua aplicação fototérmica.[140] Para avaliar a capacidade de produção de calor das AuNPs conjugadas ao sistema HTCC-AM-AuNPs, a análise de Lente Térmica (LT) foi realizada. Os transientes de LT para o HTCC-AM-AuNPs em diferentes potências de excitação podem ser vistos na Figura 26a (transientes similares também foram obtidos para água pura). No experimento de LT, usam-se diferentes potências de excitação para garantir, assim como prevê o modelo teórico, uma dependência linear da amplitude com a potência. Quando se empregam potências muito grandes, efeitos não lineares podem afetar a análise impossibilitando a aplicação do modelo teórico. O ajuste do modelo é representado pela linha contínua, e nos permite obter a difusividade térmica (D) e o parâmetro θh (este é um fator que se correlaciona com um conjunto de parâmetros físicos proporcionais à amplitude do transiente de LT) (veja na Figura 26b).

Aqui, assume-se que as propriedades do sistema HTCC-AM-AuNPs em água são muito similares às da água pura, já que no experimento de LT uma pequena concentração da amostra de HTCC-AM-AuNs foi utilizada, mudando apenas o coeficiente de absorção ótica (β) e a amplitude do sinal de LT relacionada ao rendimento do coeficiente de calor (ϕ). O rendimento de calor dá a fração de energia absorvida que é convertida em calor. Sendo assim, a razão entre $\theta_{\text{AuNPs}}/\theta_{\text{água}} = (\beta_{\text{AuNPs}} \phi_{\text{AuNPs}}/\beta_{\text{água}} \phi_{\text{água}})$. Usando os valores estimados de absorção ótica para a amostra de HTCC-AM-AuNPs a partir da absorbância em função da concentração da amostra, os valores de absorção ótica da água em 530 nm retirados da literatura[141], e o $\phi_{\text{água}} = 1$, verificou-se que aproximadamente 25% da energia absorvida é convertida em calor.

Figura 26 – (a) Transientes de LT para a amostra de HTCC-AM-AuNPs em diferentes potências de excitação (20, 30, 38, 49 mW); (b) Parâmetro θ_{th} versus potência de excitação do laser.



2.7.4 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)

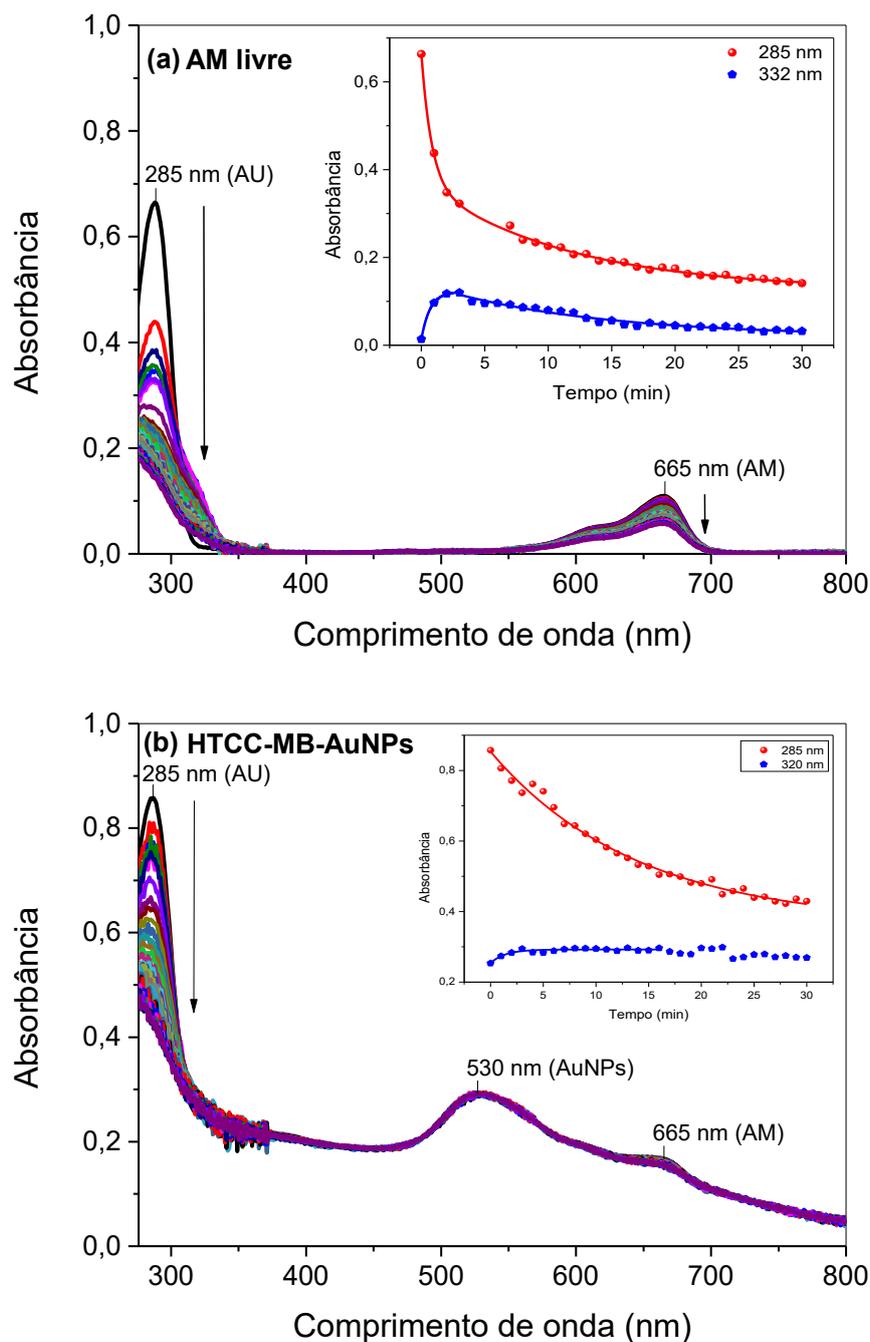
O AM foi o FS escolhido para compor o sistema HTCC-AM-AuNPs. Em sua forma livre, o AM já é amplamente reportado na literatura por ser capaz de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs), aplicável em TFD.[99], [142], [143]

Para averiguar o potencial do conjugado sintetizado, HTCC-AM-AuNPs, em aplicações fotodinâmicas, investigou-se a capacidade do AM em gerar EROs e $^1\text{O}_2$, antes e após sua conjugação ao HTCC-AM-AuNPs, mediante aplicação de luz. Para a determinação destas espécies, uma alternativa é a utilização de agentes supressores, que nada mais são do que sondas químicas que reagem com as EROs e $^1\text{O}_2$ gerados, sofrendo oxidação durante a iluminação do FS.[144] Nesta análise, o ácido úrico (AU) foi empregado como sonda para quantificação de EROs/ $^1\text{O}_2$, pelo método descrito por Fischer et al (1998), empregando-se uma luz monocromática como fonte de irradiação de uma solução aquosa contendo o FS e o AU, e medindo-se a quantidade de AU que reagiu em um determinado tempo por meio de espectrofotometria de UV-Vis.[145] A redução da absorbância do AU em 285 nm foi o parâmetro utilizado para avaliar a atividade fotodinâmica do conjugado.[146]

Os espectros de absorção UV-Vis do AM livre e do HTCC-AM-AuNPs em solução aquosa de AU podem ser observados na Figura 27, durante os primeiros 30 min de iluminação com um laser vermelho. O laser possui comprimento de onda máximo de emissão em 660 nm, muito próximo ao comprimento de onda máximo de emissão (λ_{emi}) do AM (665), fazendo com que o FS seja a principal espécie a absorver a radiação. Para o AM livre (Figura 27a), a cinética de degradação do AU (285 nm) foi ajustada para um modelo cinético com duas etapas consecutivas de primeira ordem, havendo a formação de uma espécie intermediária, observada em 332nm, nos primeiros min da iluminação, que logo é degradada (inserto na Figura 27a). Constantes de velocidade k similares foram obtidas em ambos os casos, e estão descritas na Tabela 4. O perfil cinético de degradação do AU observado para o conjugado HTCC-AM-AuNPs (Figura 27b) foi diferente daquele do AM livre, sendo ajustado a um modelo de primeira ordem. Nesse, também se observou a formação do intermediário (320 nm), que também foi acompanhada pelo modelo de primeira ordem (inserto na Figura 27b). Através dos dados da Tabela 4, podemos comparar as constantes de velocidade de degradação do AU para ambos os sistemas, onde é possível observar um ligeiro decréscimo de k_1 no conjugado HTCC-AM-AuNPs em comparação com AM livre, enquanto os valores de k_2 mantiveram-se similares em

ambas as amostras. Este é um resultado importante, uma vez que mostra que, mesmo após a incorporação do AM ao sistema nanoparticulado, a geração de EROs continua acontecendo.

Figura 27 – Espectros de absorção UV-Vis do AU ($7,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), sob iluminação ($\lambda_{\text{emi}} = 660 \text{ nm}$, 100 mW cm^{-2}), na presença de AM livre em água (a) e de HTCC-AM-AuNPs (b), $[\text{AM}] = 2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. As setas indicam a redução da absorbância do AU (285 nm) à medida em que o processo de irradiação acontece. As imagens inseridas mostram, em destaque, a variação da absorbância do AU em 285, 332 ou 330 nm, em função do tempo.



Além disso, é possível observar uma menor degradação do AM quando incorporado ao conjugado (Figura 27b, praticamente não ocorre redução da absorbância em 665 nm durante toda a iluminação). Para quantificar o efeito de fotodegradação do AM, as constantes de velocidade de fotodegradação (ou fotobranqueamento), k_{FB} , foram determinadas, e observou-se que k_{FB} para o conjugado HTCC-AM-AuNPs se apresentou ligeiramente menor do que k_{FB} do AM livre, indicando que a camada polimérica que reveste o conjugado pode agir como uma barreira protetiva, atuando na proteção do FS contra processos de fotobranqueamento. Entretanto, com o decréscimo na capacidade de geração de EROs, que são responsáveis pela ação fotodinâmica em TFD, uma intensa redução da ação fotodinâmica do AM encapsulado ao sistema HTCC-AM-AuNPs é esperada.

Tabela 4 – Constantes de velocidade k para a degradação do AU (k_1 e k_2) e constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}), em solução aquosa a 25 °C. As medidas foram realizadas na ausência e na presença de supressores.

Supressor	k (10^{-2} min^{-1})	AM livre	HTCC-AM-AuNPs
- ^a	k_1	125±10 (146±9)*	-- (72±17)*
	k_2	8,73±0,70 (7,8±1.1)*	7,01±0,70
	k_{FB}	3,01±0,59	1,83±0,51
Azida ^b	k_1	20,7±2,9	--
	k_2	1,29±0,01	--
	k_{FB}	3,31±0,12	1,77±0,33
DMSO ^c	k_1	74±17	57,9±21,2
	k_2	6,93±0,01	0,73±0,12
	k_{FB}	1,04±0,01	0,23±0,05

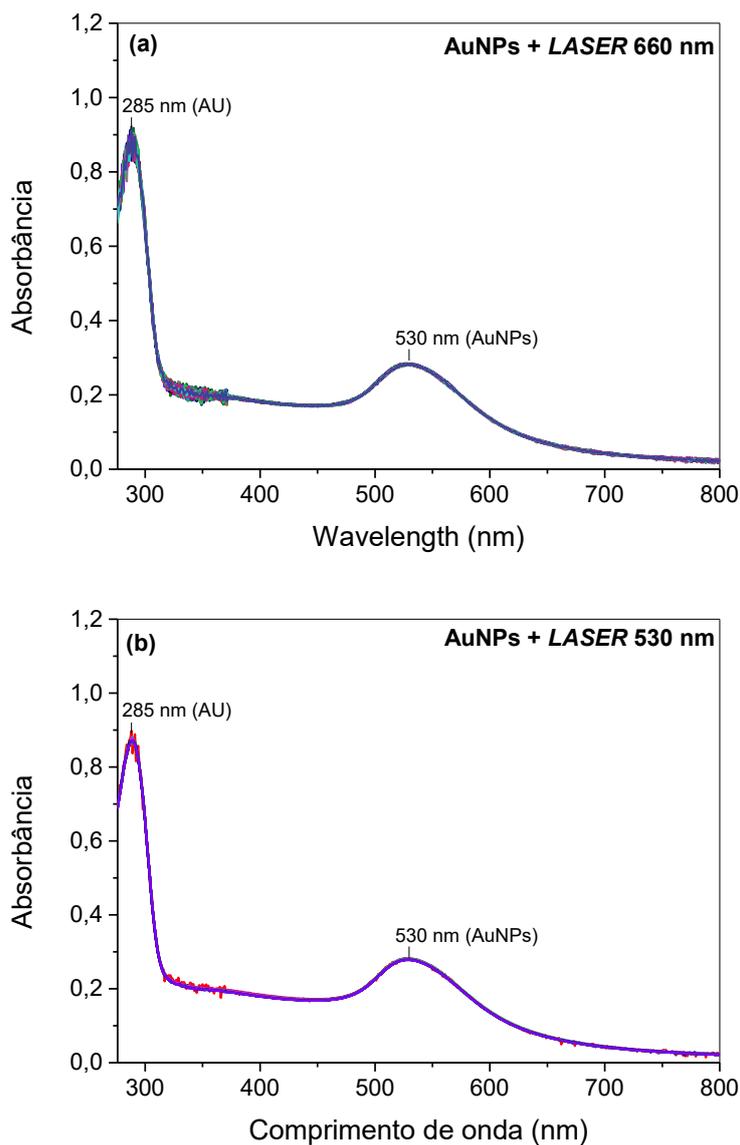
* Os valores entre parênteses foram determinados a partir das absorbâncias da espécie intermediária citada – em 332 nm para o AM livre e em 320 nm para o AM conjugado ao HTCC-AM-AuNPs.

^a Sem supressor. ^b Na presença de azida de sódio (2 mol L^{-1}). ^c Na presença de DMSO 10%.

Para descartar possíveis interferências nas constantes de velocidade calculadas para o AM no sistema conjugado, investigou-se também se as AuNPs livres poderiam ser capazes de gerar EROs quando irradiadas com luz vermelha (660 nm , 100 mW cm^{-2}) ou verde (530 nm , 100 mW cm^{-2}). A luz verde foi aplicada pois seu λ_{emi} coincide com o λ_{abs} máximo das AuNPs.

Nestes experimentos controle, o mesmo protocolo foi seguido, e os espectros contidos na Figura 28 revelaram que a absorbância do AU, em 285 nm, permaneceu constante durante toda a iluminação, com ambos os lasers, provando que as AuNPs não são capazes de produzir EROs.

Figura 28 – Espectros de UV-Vis do AU ($7,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) na presença de AuNPs livres, sob irradiação com um (a) laser vermelho ($\lambda_{\text{emi}} = 660 \text{ nm}$) e (b) laser verde ($\lambda_{\text{emi}} = 530 \text{ nm}$). $[\text{AuNPs}] = 1 \times 10^{-10} \text{ mol L}^{-1}$.



Visando identificar as EROs geradas por HTCC-AM-AuNPs, realizou-se a degradação do AU na presença de agentes supressores específicos, sendo eles: (i) azida de sódio e (ii) DMSO. A azida de sódio é um substrato conhecido, muito utilizado na supressão de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$)[147], enquanto que o DMSO é um bom agente supressor do radical hidroxila

(•OH)[148], que é um dos principais radicais gerados pelo AM, assim como reportado na literatura.[149] Os resultados estão dispostos na Tabela 4. Assim como pode-se perceber, para o AM livre as constantes de velocidade k_1 e k_2 diminuíram bruscamente na presença de azida de sódio, mas não tiveram um decréscimo muito acentuado na presença de DMSO. Estas k indicam que o processo de fotodegradação do AU é fortemente dependente da geração de $^1\text{O}_2$ no meio. Ainda que não tenha sido possível observar a degradação do AU na amostra de HTCC-AM-AuNPs, a mesma tendência foi observada. Na direção contrária, ao analisar a principal espécie responsável pelo processo de fotobranqueamento do AM, percebemos que o processo é dependente da participação de radicais livres de •OH, uma vez que na presença de azida de sódio, as k_{FB} permaneceram praticamente inalteradas, porém na presença de DMSO as k_{FB} sofreram redução notável. A mesma tendência foi observada para AM livre e HTCC-AM-AuNPs.

As medidas de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica confirmaram a formação dos radicais •OH, empregando DMPO como capturador de radicais. Foram analisadas as seguintes amostras: AM livre em água, HTCC-AM-AuNPs e o grupo controle HTCC-AuNPs. Após 3 min de irradiação (660 nm, 100 mW cm⁻²) os espectros da Figura 29 foram coletados, mostrando que o grupo controle HTCC-AuNPs não foi capaz de gerar EROs, conforme esperado. Todavia, na amostra contendo AM livre, um sinal intenso foi observado, na razão 1:2:2:1. Ao se fazer a simulação deste espectro (Figura 30), os parâmetros encontrados foram de $aN = 14,9437$ e $aH = 14,6276$ G, que estão de acordo com a presença de radical hidroxila. Na análise da amostra HTCC-AM-AuNPs, a mesma tendência foi observada, apresentando, porém, uma menor intensidade dos sinais associados ao •OH, sugerindo então que, no conjugado, ele é formado em menor quantidade, estando em acordo com os estudos cinéticos dispostos acima.

Figura 29 – Espectros de RPE obtidos para as soluções contendo (em cima) DMPO + HTCC-AuNPs; (meio) DMPO + AM livre e (embaixo) DMPO + HTCC-AM-AuNPs, após 3 min de iluminação.

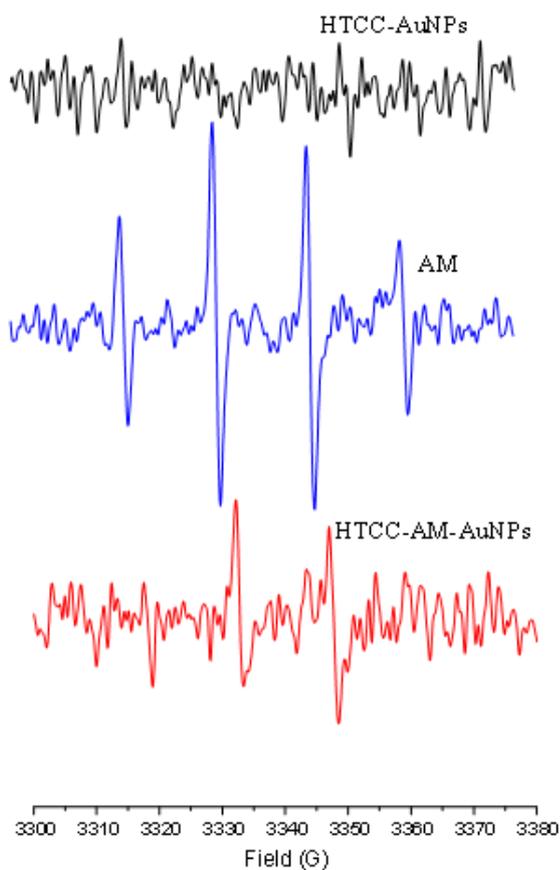
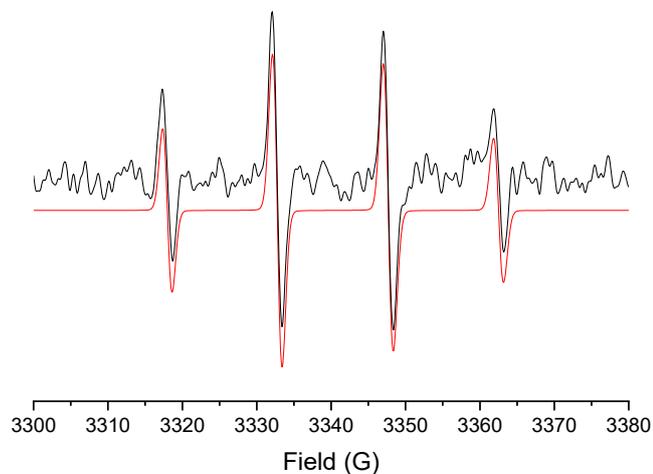


Figura 30 – Espectro RPE experimental (linha preta) e simulado (linha vermelha), para a amostra DMPO + AM livre, irradiado por 3 min. Parâmetros de simulação: $aN = 14.9437$ G; $aH = 14.6276$ G.



2.7.5 Testes biológicos: avaliação de terapia fototérmica e fotodinâmica *in vitro*

Após todas as caracterizações realizadas para o conjugado HTCC-AM-AuNPs terem revelado sua capacidade de elevação da temperatura local e de produção de EROs, avaliou-se seu potencial em causar citotoxicidade *in vitro* contra células de câncer de mama do tipo MDA-MB231, tanto no escuro quanto na presença de luz. Para visualização da densidade celular após a realização dos testes, foi empregado o ensaio colorimétrico da Sulforodamina B, teste este que é um indicativo sensível da citotoxicidade induzida por fármacos/FS.[150]

Para os testes, foram empregados três grupos controle, para contabilizar possíveis contribuintes citotóxicos isolados, sendo eles: as nanopartículas de ouro livres em solução aquosa (AuNPs); azul de metileno livre em solução aquosa (AM) e as nanopartículas de ouro revestidas com o polímero HTCC em solução aquosa (HTCC-AuNPs). As amostras foram incubadas com as células de câncer MDA-MB231 por 48 h, em diferentes concentrações. Para as amostras contendo AM – HTCC-AM-AuNPs e AM livre – as concentrações de AM nos poços foram de 0,5; 1,0 e 2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$, enquanto para as amostras contendo AuNPs – AuNPs livres e HTCC-AuNPs – as concentrações de AuNPs variaram entre $6,75 \times 10^{-10}$; $2,7 \times 10^{-10}$ e $1,35 \times 10^{-10}$ mol L^{-1} .

No escuro, com exceção do AM livre, as amostras apresentaram baixa toxicidade contra as células, assim como pode-se observar na Figura 31 – que traz imagens da densidade celular ao final dos testes, de forma qualitativa – e na Figura 32a, de forma quantitativa. Na Figura 31, pode-se perceber que os poços tratados no escuro se encontram preenchidos de células após a realização do ensaio, uma vez que a coloração rosa indica um baixo percentual de morte celular. Da Figura 32a, ressalta-se que, para a maior concentração de AM (2,5 $\mu\text{mol L}^{-1}$), a densidade celular registrada foi pouco inferior a 65 % para o AM livre, e aproximadamente 85% para o conjugado HTCC-AM-AuNPs, quando comparados às células controle (100%). A partir destes dados, pode-se perceber que a incorporação do AM na camada polimérica de HTCC auxiliou na redução de sua toxicidade no escuro, o que é extremamente importante considerando futuras aplicações *in vivo* em TFD e TFT. Muitos estudos publicados na literatura já reportaram a toxicidade no escuro de diversos FS, inclusive do AM, principalmente em doses altas (acima de 20 $\mu\text{mol L}^{-1}$)[151]. Entretanto, os resultados também indicam que $^1\text{O}_2$ e EROs (espécies formadas perante iluminação) não estão envolvidas nos

processos de destruição das células, neste caso.[152] Para os grupos controle nanopartícula de ouro livre (AuNPs) e recoberta com polímero (HTCC-AuNPs) não foi observado efeito citotóxico no escuro (Figura 32a).

Para as células tratadas com luz (30 min, luz branca, $55,3 \text{ J cm}^{-2}$), o conjugado HTCC-AM-AuNPs se mostrou altamente citotóxico, reduzindo a densidade celular a 10% (Figura 32b) na menor concentração aplicada ($0,5 \mu\text{mol L}^{-1}$), o que é possível observar nos poços sem coloração da Figura 31. Este resultado mostra que o conjugado foi eficaz em promover a morte celular mesmo em baixas concentrações. É interessante perceber que o AM livre apresentou eficácia citotóxica *in vitro* similar à do conjugado (Figura 32b). Em adição, os controles de AuNPs livres e HTCC-AuNPs não apresentaram citotoxicidade na presença de luz. A incorporação do AM às AuNPs recobertas com HTCC modificou suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas, havendo um decréscimo acentuado em sua emissão de fluorescência, bem como uma ligeira redução de reatividade em reações modelo, como fora discutido nas sessões antecedentes. Apesar disso, apresentou forte efeito na redução da densidade das células de câncer, em ligeira maior proporção em comparação ao efeito causado pelo AM livre, o que indica que, no conjugado, houve o efeito combinado de TFD e TFT. Além disso, o conjugado favoreceu a estabilização do AM.

Os resultados dos testes biológicos evidenciaram que, apesar do efeito fototerapêutico do conjugado HTCC-AM-AuNPs ser muito próximo ao do AM livre, o conjugado demonstrou efeito sinérgico de TFD e FTF, com excelente capacidade de causar morte de células de câncer *in vitro*.

Figura 31 – Células de câncer de mama MDA-MB231 plaqueadas nos poços, após ensaio de citotoxicidade *in vitro* com HTCC-AM-AuNPs e os grupos controle AM livre, AuNPs livres e HTCC-AuNPs. Em cima: amostras tratadas no escuro; Embaixo: amostras tratadas com luz (30 min, sistema de LED com luz branca, $55,3 \text{ J cm}^{-2}$)

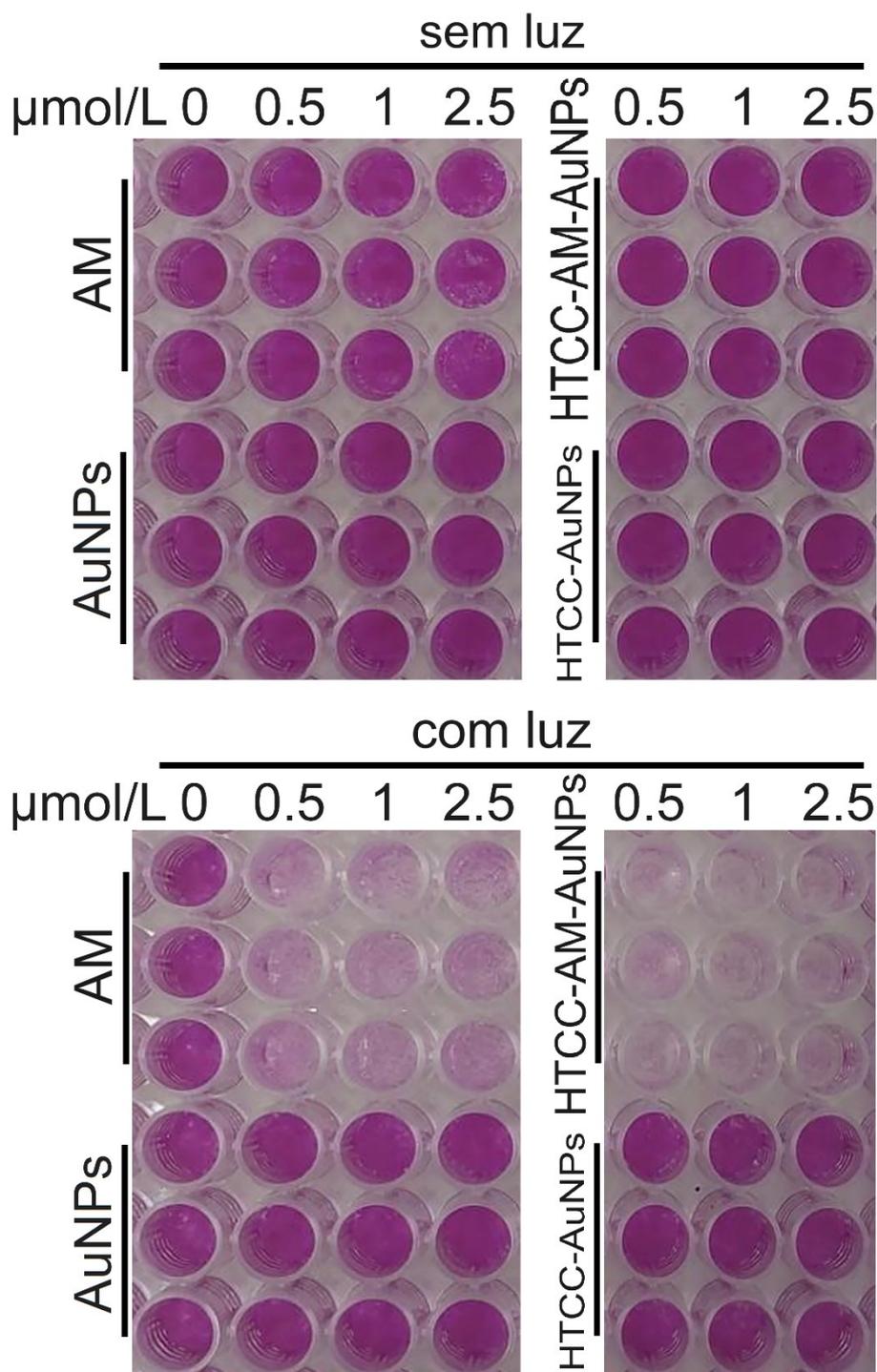
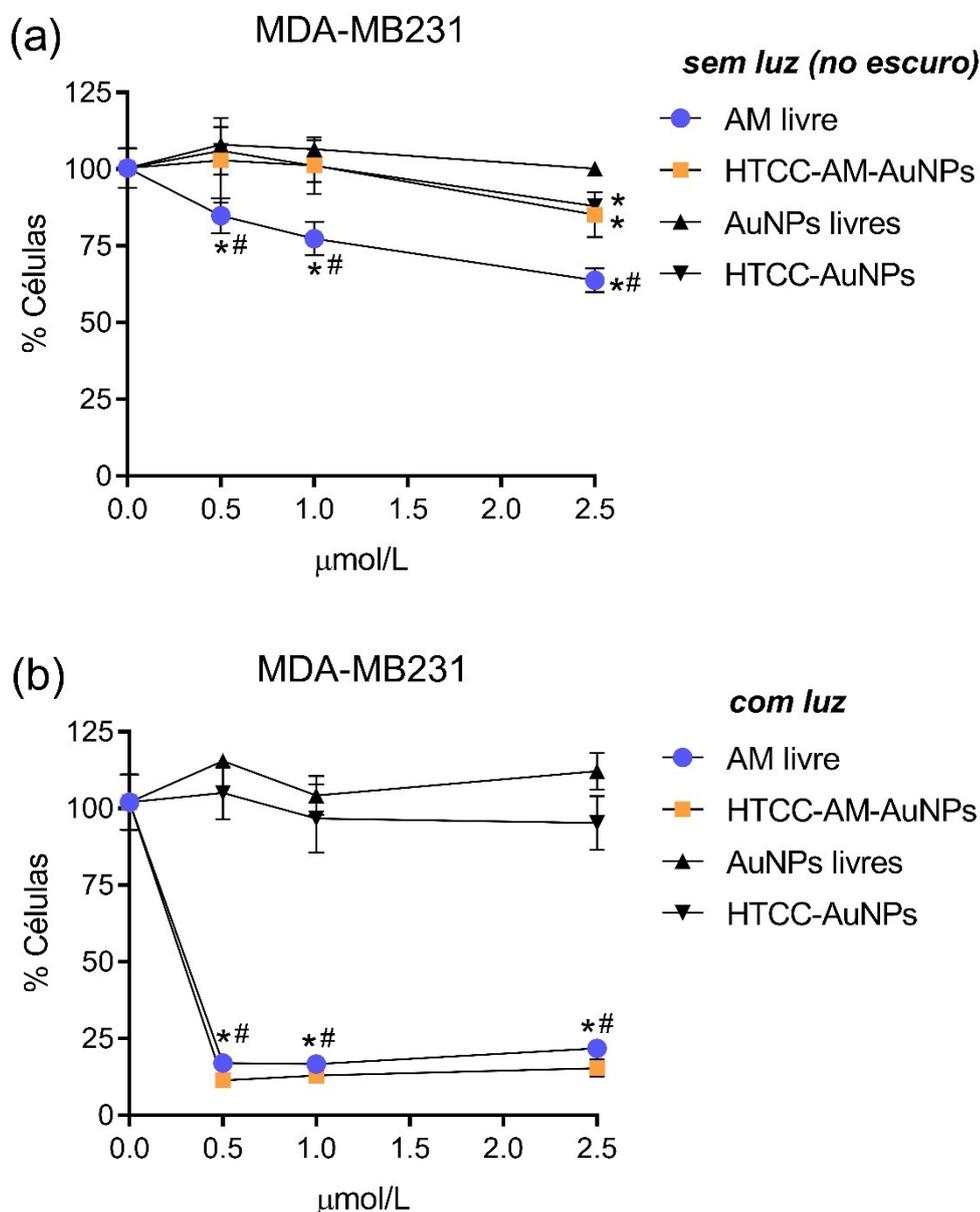


Figura 32 – Ensaio de citotoxicidade celular pelo método colorimétrico de SRB, comparando o efeito dos grupos controle AM livre, AuNPs livres e HTCC-AuNPs e do conjugado HTCC-AM-AuNPs contra células de câncer de mama MDA-MB231, (a) no escuro e (b) com iluminação (30 min, 55,3 J cm⁻²). Os gráficos mostram a percentagem de células que sobreviveram ao tratamento, em diferentes concentrações das amostras.



2-way ANOVA Tukey para comparações múltiplas e valores de p ajustados.

*diferente do controle não tratado.

diferente do controle não tratado e de todos os outros tratamentos na mesma concentração. & diferente de todos os outros tratamentos e AM sem fototerapia na mesma concentração.

CONCLUSÕES PARCIAIS

A síntese do conjugado HTCC-AM-AuNPs se deu através de interações eletrostáticas, em que AuNPs, recobertas com citrato e, portanto, aniônicas, foram funcionalizadas com o FS 2.8 catiônico AM e revestidas com o polímero catiônico HTCC. Abaixo estão listadas as principais propriedades apresentadas pelo conjugado:

- Tamanho hidrodinâmico igual a 47,6 nm e tamanho médio obtido por microscopia eletrônica de aproximadamente 150 nm;
- Potencial Zeta positivo, de +26,6 mV;
- Morfologia esférica da nanopartícula;
- Capacidade de conversão de 25% da energia absorvida (luz) em calor;
- Capacidade de produção de EROs e de $^1\text{O}_2$, havendo uma maior participação do radical hidroxila $\cdot\text{OH}$ (cuja formação foi confirmada por RPE) nos processos de fotobranqueamento do AM, e maior contribuição do $^1\text{O}_2$ na degradação do AU;
- Fotoproteção ao AM fornecida pelo conjugado, graças à camada polimérica de HTCC;
- Redução significativa da toxicidade no escuro do AM contra células de câncer de mama *in vitro*, fator associado ao recobrimento polimérico;
- Capacidade de inativar cerca de 90% das células de câncer de mama MDA-MB231 *in vitro*, em uma única aplicação, com 30 min de iluminação de luz branca ($55,3 \text{ J cm}^{-2}$).

A fotoproteção apresentada pelo AM quando incorporado ao conjugado HTCC-AM-AuNPs é de extrema importância para futuras aplicações *in vivo*, considerando que, se o FS sofre uma rápida fotodegradação à medida em que é iluminado, durante a aplicação do tratamento, sua concentração pode se reduzir a um ponto em que não seja capaz de gerar citotoxicidade suficiente para gerar o fotodano às células alvo, prejudicando a eficácia do tratamento.

O conjugado HTCC-AM-AuNPs foi eficaz na inativação de células de câncer de mama *in vitro*, apresentando resultado superior a todos os grupos controles testados, indicando que a soma entre os componentes fotoativos do sistema (AuNPs e AM) proporcionou efeito sinérgico resultante da combinação entre TFT e TFD, almejados inicialmente.

PARTE II

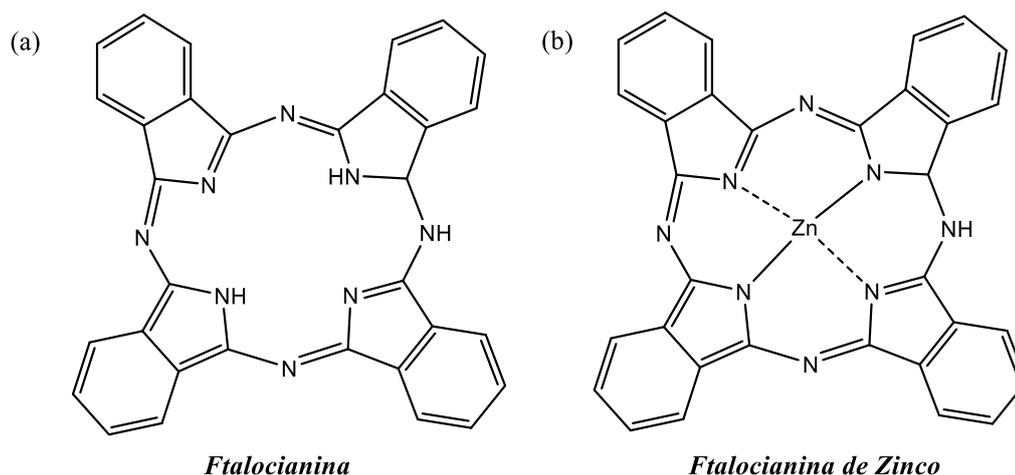
3

**COMPLEXO POLIELETROLÍTICO CARREGADO COM FTALOCIANINA
DE ZINCO (II) DIRECIONADO COM BIOTINA COMO ALTERNATIVA PARA
TERAPIA FOTODINÂMICA**

INTRODUÇÃO

Quando falamos em FS com eficácia comprovada em TFD, a família das Ftalocianinas (Figura 33a) compõe um conjunto de moléculas que compreende as características desejáveis para aplicação fotodinâmica. Compostas por heterociclos aromáticos unidos a partir de pontes de nitrogênio que conectam quatro unidades isoindol, estas oferecem alta estabilidade química, baixa citotoxicidade no escuro e alto rendimento quântico de geração de EROs, além de forte absorção de luz na região de 630 nm.[153] As ftalocianinas podem coordenar-se à diferentes metais, como zinco, magnésio, alumínio e silício, de forma que suas propriedades fotoquímicas são significativamente alteradas na presença dos diferentes metais. A ftalocianina de zinco II (ZnPc – Figura 33b) tem sido empregada em diferentes estudos fotodinâmicos, uma vez que a coordenação ao íon zinco(II), Zn^{+2} , íon paramagnético, confere à ela um maior rendimento quântico de estado tripleto (ϕ_T), elevando sua capacidade de produção de EROs (exemplo, para ftalocianina não metalada (Pc) em DMF, $\phi_T = 0,24$; para ZnPc em tolueno/1% piridina $\phi_T = 0,58$ [672 nm]) .[154] A ZnPc pertence à família das metaloftalocianinas, classe de compostos que possui reportes na literatura como promissora para o tratamento de alguns cânceres metastáticos, conforme discutido na Seção 1.[53]

Figura 33 – (a) Estrutura geral das ftalocianinas (esquerda); (b) Estrutura da ftalocianina de zinco.



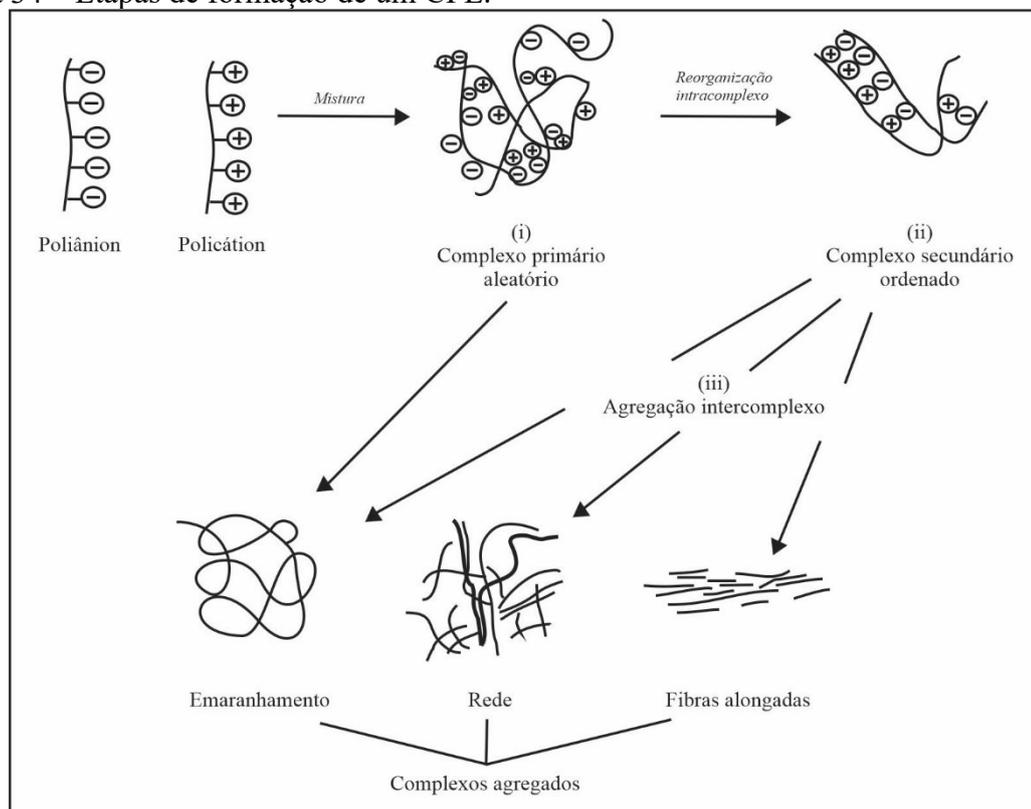
Apesar das numerosas vantagens que a ZnPc oferece, ela apresenta uma limitação específica que compromete sua aplicação, que é a baixa solubilidade em água e na maioria dos

solventes orgânicos. Quando aplicada em sua forma livre em solução, a ZnPc forma auto agregados que reduzem drasticamente sua capacidade de produção de EROs/ $^1\text{O}_2$, uma vez que a ação fotoquímica de um FS depende essencialmente da presença de espécies monoméricas.[155] Uma estratégia para aumentar a solubilidade desta molécula consiste na inserção de substituintes ao anel, que resultem em uma molécula com maior momento de dipolo. Todavia, tais reações já demonstraram ser dispendiosas, além de levarem à formação, em alguns casos, de isômeros cuja separação e purificação é dificultosa.[156] Além disso, alterações estruturais podem afetar o comportamento fotoquímico da molécula, e, em uma desfavorável hipótese, reduzir sua capacidade de produção de EROs.[157] Para evitar esses possíveis efeitos os sistemas de entrega nanoestruturados entram como uma ferramenta valorosa, capazes de encapsular o FS hidrofóbico e permitir sua aplicação na forma de monômero, sem implicar em alterações estruturais abruptas. A ZnPc já foi encapsulada em nanopartículas obtidas a partir do copolímero poli(ácido lático-co-ácido glicólico), PLGA, para fins de aplicação em TFD, não apresentando alterações em seu comportamento fotofísico pós encapsulamento.[158] Assim como este, muitos outros estudos já empregaram micelas[159], nanocapsulas poliméricas[160], lipossomas[161], entre outros sistemas nanoestruturados para o encapsulamento de ZnPc.

Os complexos polieletrólíticos (CPEs) são um tipo de sistema nanoestruturado cujo potencial para aplicação na incorporação e entrega de FS tem sido investigada. Eles são formados a partir da interação eletrostática entre polieletrólitos de cargas opostas, em um processo espontâneo após a mistura de soluções aquosas contendo policátions e poliânions. Interações inter-macromoleculares também podem estar envolvidas na formação destes complexos, como, por exemplo, ligações de hidrogênio, interações dipolo-dipolo, forças de van der Waals e interações hidrofóbicas, dispensando o uso de agentes reticulantes.[162] Segundo Lankalapalli e Kolapalli (2009), a formação dos CPEs envolve, em termos gerais, três etapas consecutivas (Figura 34). Na primeira etapa ocorre a formação de um complexo primário de organização aleatória, montado a partir de forças de Coulomb. A segunda etapa envolve as interações intracomplexo, que levam a interações eletrostáticas e ajuste na distorção das cadeias poliméricas, contribuindo para uma maior ordenação. Por fim, ocorre a agregação intercomplexos, que ocorre principalmente através de interações hidrofóbicas.[163] Em geral, os CPEs apresentam boa biocompatibilidade e estabilidade. Muitos fatores podem modular a formação e estabilidade destes agregados, dentre eles: o grau de ionização dos polieletrólitos

envolvidos, a sua concentração, proporção, massa molar, distribuição de cargas sobre a cadeia polimérica, flexibilidade, pH, força iônica e temperatura do meio.[162] Neste sentido, para a Parte II desta Tese os CPEs foram propostos como sistema de encapsulamento para a ZnPc.

Figura 34 – Etapas de formação de um CPE.



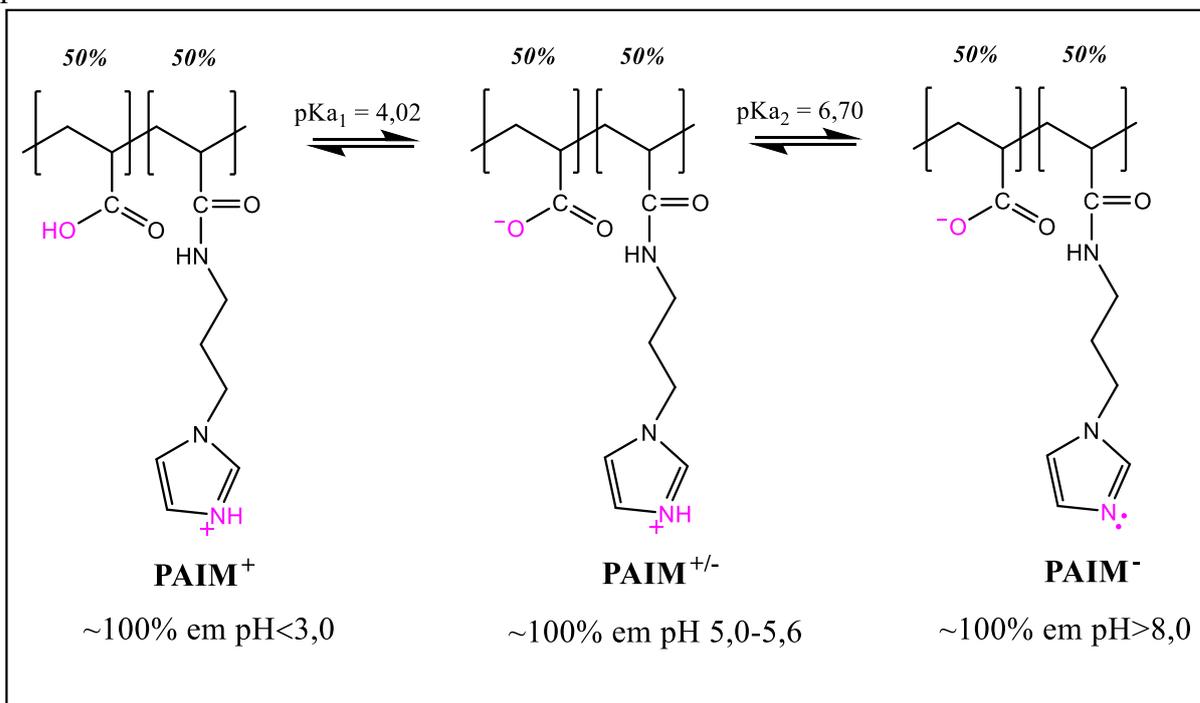
Fonte: Adaptado de Lankalapalli e Kolapalli (2009).[163]

Conforme mencionado, a obtenção de um CPE envolve a aplicação de polímeros contendo em sua estrutura cargas opostas. No decorrer desta Tese, por vezes evidenciou-se o potencial da quitosana na construção de sistemas de entrega para aplicações biológicas. Mais uma vez, propõe-se a aplicação de um de seus derivados, a *N,N,N*-Trimetil quitosana (TMC), para a síntese de um CPE. A TMC (Figura 10, seção 1.2.1) é um derivado catiônico da quitosana, resultante da trimetilação do grupo amina dos monômeros desacetilados, que confere ao polímero uma carga positiva fixa não dependente do pH. Neste sentido, a TMC possui potencial para ser aplicada como um polieletrólito catiônico, onde se propõe que seus grupos amino quaternários (+) podem interagir com grupos aniônicos de um polímero secundário (grupos carboxilato, por exemplo), levando a formação do complexo.[164] Um estudo de

Martins e colaboradores (2011) demonstrou a capacidade da TMC em formar CPEs junto à heparina, que se provaram mais estáveis quando obtidos em pHs mais elevados, em que as estruturas de equilíbrio ácido/base dos polímeros envolvidos proporcionaram interações eletrostáticas mais intensas.[165] A TMC também já foi aplicada na síntese de CPEs para entrega de vacinas de subunidades peptídicas.[166]

Para compor o complexo, restou definir o polieletrólito aniônico. O polímero poliácido acrílico funcionalizado com grupos imidazóis (PAIm) foi sintetizado e caracterizado por nosso grupo de pesquisa, assim como reportado na literatura por Giusti et al. (2014).[167] Este polímero contém em sua estrutura, grupos imidazol e carboxilato proporções iguais (1:1). O PAIm possui diferentes estruturas iônicas predominantes que dependem do pH do meio em que se encontra, assim como é descrito na Figura 35. Isso significa que ele pode ser empregado como um polieletrólito aniônico em determinados pHs.

Figura 35 – Equilíbrios ácido-base e estruturas iônicas do polímero PAIm, de acordo com seus pK_{as} .

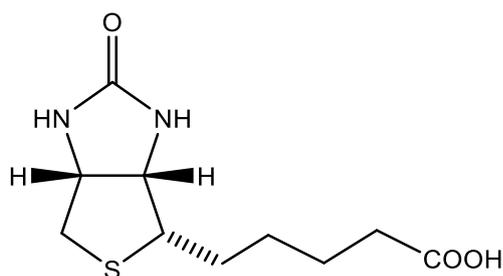


Fonte: Adaptado de Giusti (2014)[167]

Quando sistemas de entrega são planejados para a aplicação futura no tratamento de câncer, é ideal que eles sejam seletivos às células alvo, para que os efeitos colaterais associados

às células saudáveis do organismo sejam minimizados. Uma estratégia para aumentar a especificidade consiste em sintetizar sistemas de tamanho pequeno (<500 nm), que possam beneficiar-se do mecanismo de acúmulo passivo proporcionado pelo Efeito de Retenção e Permeabilidade Aumentada, estratégia empregada na Parte I desta Tese. Para elevar ainda mais a especificidade, pode-se combinar o mecanismo de acúmulo passivo com o mecanismo ativo, que se baseia no reconhecimento molecular. Para tanto, um dos polímeros empregados na produção do CPE é funcionalizado com um ligante específico, capaz de reconhecer seu receptor (biomarcador) presente nas células. Normalmente, as células de câncer estão repletas de receptores que não são encontrados em células saudáveis, devido à alta demanda de nutrientes.[168] A interação entre ligante e receptor facilita a entrega seletiva do FS através de endocitose. Por exemplo, a biotina (Figura 36), também conhecida como vitamina H, é um agente de crescimento em nível celular, sendo entregue principalmente às células cuja taxa de multiplicação é alta, como as células de câncer. Estudos recentes mostraram que seus receptores estão superexpressos em muitos tipos de células cancerosas em uma maior quantidade do que os receptores de outras vitaminas como folato e vitamina B12. Dentre as linhagens celulares que possuem alta expressão de receptores de biotina, podemos citar: linhagem de câncer de cólon (Colo-26); de câncer de pulmão (M109); de câncer de rins (RENCA, RD0995), de câncer de ovário (Ov2008, ID8), de leucemia (L1210FR), entre outras.[169] Por esta razão, neste trabalho optou-se por empregar a biotina como agente direcionador para o CPE sintetizado. O grupo funcional ácido carboxílico presente na estrutura da biotina (na forma de ácido pentanóico – Figura 36) pode ser utilizado para conjugar a biotina à diferentes moléculas, permitindo a funcionalização da superfície do CPE com biotina. Este processo pode ser feito através da funcionalização individual de um dos polieletrólitos constituintes do sistema, antes de sua conjugação.[66] A biotina pode reagir com o grupo funcional amina presente na estrutura da TMC, levando à formação de uma ligação amida, o que proporcionará a funcionalização do polímero.

Figura 36 – Estrutura da biotina.



Essa estratégia foi empregada por Balan et al. (2016), em um estudo no qual os pesquisadores funcionalizaram com biotina a *N*-palmitol quitosana, empregando posteriormente o polímero como sistema automontável de entrega de docetaxel, fármaco empregado no tratamento de câncer de mama. O sistema resultou em nanopartículas praticamente esféricas, com tamanho variando de 300 a 400 nm e carga superficial positiva, apresentando-se como uma alternativa interessante para o encapsulamento do medicamento.[170] Em 2017, Cheng e colaboradores propuseram a síntese de uma quitosana biotinizada para a confecção de nanopartículas com DNA plasmidial, em proporção 1:1 e pH 5,5, resultando em uma nanopartícula de carga superficial positiva e tamanho de aproximadamente 83 nm, que apresentou efeitos de direcionamento ativo para câncer de fígado nos testes *in vitro* e *in vivo*, promovendo a inibição da proliferação de células cancerosas.[171] Mais recentemente, em 2022, Guo et al. biotinizaram a TMC, formando a então denominada Bio-TMC, empregando-a na síntese de um CPE em conjunto com tripolifosfato de sódio e ftalato de hidroxipropilmetilcelulose (HP-55). O complexo foi empregado no encapsulamento de Exenatida (medicamento de controle glicêmico) e mostrou ser um promissor sistema de entrega.[172] Na literatura, uma sequência considerável de artigos emprega o derivado de quitosana, TMC biotinizada na construção de sistemas nanoestruturados para a entrega de fármacos de uso em quimioterapia e no tratamento de outras doenças[173], mas não se encontram estudos que apliquem este sistema para o encapsulamento de FS e emprego em fototerapias, o que abre um leque de possibilidades de estudo.

OBJETIVOS

O objetivo geral da **Parte II** desta Tese de doutorado baseou-se no preparo, caracterização e aplicação biológica *in vitro* de um complexo polieletrólítico (CPE), sintetizado para o encapsulamento do FS ZnPc, para aplicação em TFD. O CPE é denominado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, contendo os seguintes componentes:

- PAIm-12: Poli (ácido acrílico) funcionalizado por grupos imidazóis, ligados por ligações amidas, que posteriormente foi alquilado com 1-bromo dodecano, visando aumento de cadeia carbônica;
- ZnPc: Ftalocianina de zinco, FS aplicável em TFD, insolúvel em água, solúvel em dimetilformamida (DMF);
- Bio-TMC: *N,N,N*-trimetil quitosana, funcionalizada com biotina.

Para tanto, os seguintes objetivos específicos foram delimitados:

- Caracterizar o FS ZnPc quanto a seus perfis de absorção de luz UV-Vis e de emissão de fluorescência;
- Sintetizar o derivado quaternário da quitosana, cloreto de *N,N,N*-trimetil quitosana (TMC) a partir da quitosana, purificá-lo por meio de diálise e liofilizá-lo;
- Caracterizar a TMC a partir de análises de RMN ¹H, titulação potenciométrica, análise elementar e infravermelho, e determinar o percentual de unidades desacetiladas que sofreram alquilação, mensurando seu grau de quaternização (GQ) e grau de dimetilação (GDM);
- Funcionalizar a TMC com biotina (BioTMC), através de uma reação de amidação, caracterizá-la através de RMN ¹H e FT-IR;
- Alquilar o polímero PAIm com 1-bromo dodecano (PAIm-12), caracterizar ambos a partir de RMN de ¹H, infravermelho e titulação potenciométrica;
- Determinar as concentrações agregacionais críticas (cac) do PAIm e do PAIm-12;
- Analisar o pH ideal para a síntese do CPE a partir dos pK_as obtidos experimentalmente e equilíbrios ácido-base dos polímeros envolvidos;
- Sintetizar o CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC em pH 5,5, empregando interações eletrostáticas como força motriz;

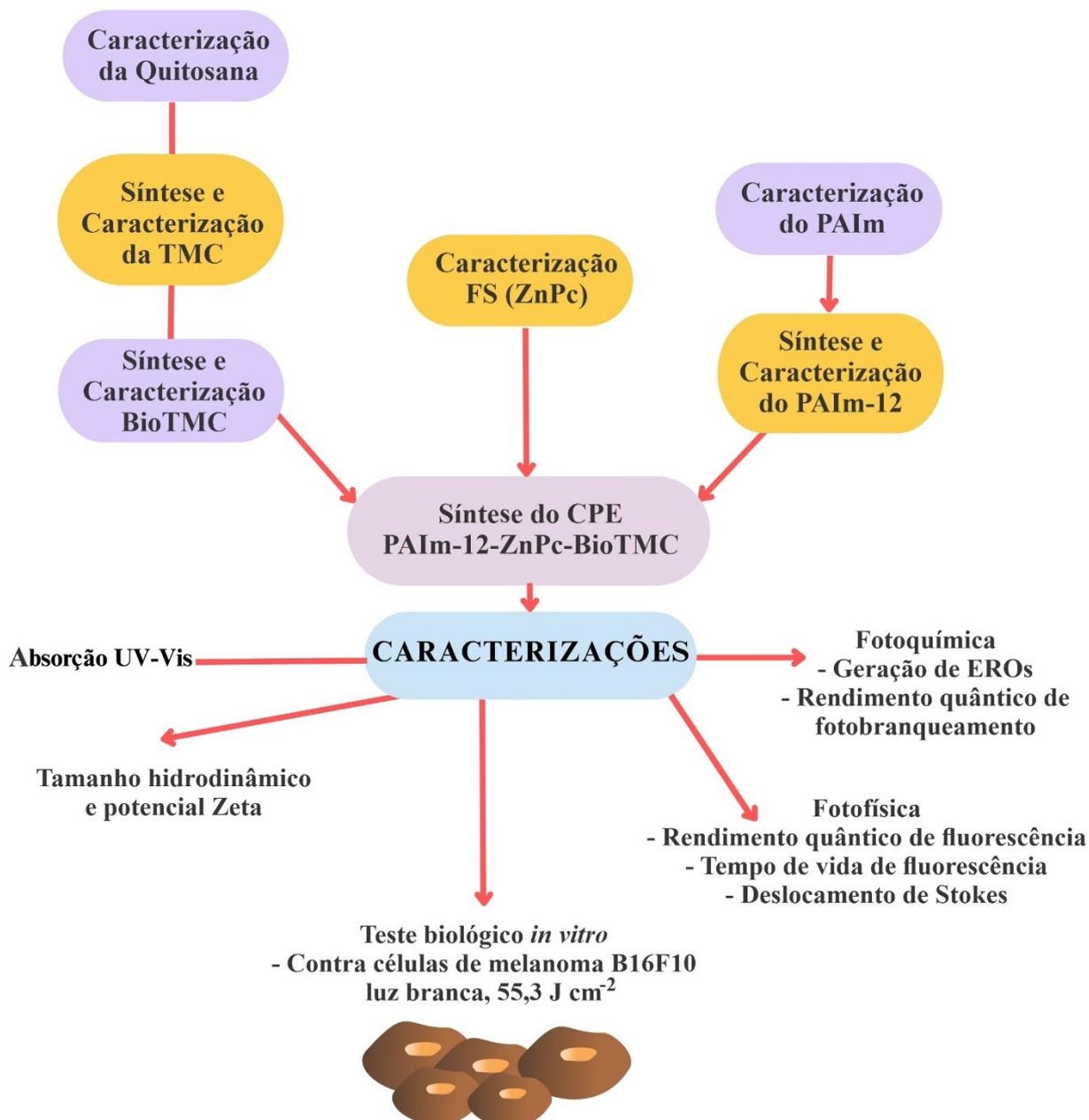
- Caracterizar os componentes do CPE individualmente em pH 5,5 por FT-IR, afim de averiguar possíveis alterações que indiquem formação de complexo;
- Caracterizar o intermediário PAIm-12-ZnPc e o CPE quanto ao seu tamanho hidrodinâmico e potencial Zeta;
- Caracterizar o CPE quanto a seus perfis de absorção UV-Vis e de emissão de fluorescência e tempo de meia vida de emissão de fluorescência;
- Investigar a capacidade da ZnPc livre e encapsulada no CPE em formar $^1\text{O}_2$, empregando ABDA como sonda, na presença de luz (laser vermelho, 660 nm, 100 mW cm^{-2});
- Investigar a formação de EROs/ $^1\text{O}_2$, pela ZnPc livre e encapsulada no CPE na presença de um supressor de $^1\text{O}_2$ (azida de sódio) e um supressor de $\bullet\text{OH}$ (DMSO), empregando luz (laser vermelho, 660 nm, 100 mW cm^{-2});
- Avaliar a fotoestabilidade da ZnPc livre (em água e em etanol) e encapsulada no CPE, empregando como fonte de luz um laser vermelho (660 nm, 100 mW cm^{-2});
- Averiguar a citotoxicidade *in vitro* da ZnPc livre e do CPE contra células de melanoma B16F10, no escuro e na presença de luz.

PARTE EXPERIMENTAL

O Fluxograma 2 declara o passo a passo metodológico aplicado na síntese, caracterização e aplicação do sistema proposto na **Parte II**.

3.3

Fluxograma 2 – Metodologias aplicadas na Parte II.



MATERIAIS

Todas as soluções aquosas utilizadas na parte experimental II desta Tese de Doutorado foram preparadas utilizando água ultrapura Milli-Q (resistividade > 18 MΩ cm).

3.4 A Quitosana comercial de baixa massa molar (MM = 50000 – 190000 Da, grau de desacetilação de 74%; CAS: 9012-76-4) e o hidróxido de sódio (NaOH, MM = 39,99 g mol⁻¹, pureza ≥ 97%; CAS: 1310-73-2) foram adquiridos de Sigma-Aldrich. O reagente iodeto de metila (CH₃I, MM = 141,94 g mol⁻¹; densidade de 2,28 g cm⁻³; CAS: 74-88-4) foi adquirido de Vetec. Os sacos de diálise (Dialysis sacks D6191-25EA de largura média plana de 25 mm, com limite de massa molecular de 12.000 Daltons; CAS: 9004-34-6) foram adquiridos de Sigma-Aldrich. A biotina (C₁₀H₁₆N₂O₃S, MM = 244,31 g mol⁻¹; CAS: 58-85-5) foi adquirida de Êxodo Científica. O tampão Ácido 2-(*N*-morfolino) etanossulfônico (MES, C₆H₁₃NO₄S.H₂O, MM = 213,23 g mol⁻¹, pureza ≥ 99,5%, CAS: 145224-94-8), o reagente *N*-hidroxissuccinimida (NHS, C₄H₅NO₃; MM = 115,09 g mol⁻¹; CAS: 6066-82-6) e o reagente 1-etil-3-(3'-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDAC, C₈H₁₇N₃; MM = 155,24 g mol⁻¹; CAS: 25952-53-8) foram adquiridos de Aldrich.

O reagente 1-bromododecano (CH₃(CH₂)₁₁Br; MM = 249,23 g mol⁻¹; CAS: 143-15-7) foi adquirido também de Aldrich, assim como o FS ftalocianina de zinco II (ZnPc, C₃₂H₁₆N₈Zn, MM = 577,91 g mol⁻¹; CAS: 14320-04-8) e as sondas ácido 9,10-antraceniil-bis(metileno)dimalônico (ABDA, C₂₂H₁₈O₈; MM = 410,37 g mol⁻¹; pureza ≥ 90%; CAS: 307554-62-7), dimetilsulfóxido (DMSO) de alta pureza, azida de sódio (NaN₃, MM = 65,01 g mol⁻¹, CAS: 26628-22-8) e 5,5-dimetil-1-pirrolina-*N*-óxido (DMPO, C₆H₁₁NO; MM = 113,16 g mol⁻¹; CAS: 3317-61-1). A sonda de polaridade pireno (C₁₆H₁₀; MM = 202,25 g mol⁻¹; pureza ≥ 98%; CAS: 129-00-0) foi adquirida de Aldrich.

INSTRUMENTAÇÃO

Os polímeros sintetizados neste trabalho foram liofilizados através de um liofilizador Edwards Micro Modulyo pertencente ao laboratório do Grupo de Estudo em Materiais Poliméricos (Polimat) do Prof. Dr. Alexandre Parise (UFSC).

A síntese da TMC foi realizada com auxílio e supervisão do Prof. Dr. Edward Westphal do Grupo de Pesquisa em Materiais Moleculares e Mesomórficos (GPM₃), localizado no Bloco da Colina do Departamento de Química da UFSC.

Os experimentos de Espectroscopia de Ressonância Paramagnética Eletrônica foram realizados em conjunto com o Prof. Dr. Adolfo Horn Junior, na Central de Análises.

Os testes biológicos *in vitro* foram realizados em parceria com o Professor Dr. Alfeu Zanotto Filho, no Laboratório de Farmacologia e Bioquímica do Câncer (LabCancer) do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UFSC.

METODOLOGIA

3.6 3.6.1 Caracterização do FS Ftalocianina de Zinco (ZnPc)

Os espectros de absorção UV-Vis da ZnPc foram obtidos através de um espectrofotômetro Cary 50 Varian, de 300 a 800 nm, em água deionizada e em etanol. Como a ZnPc não é solúvel nestes solventes, partiu-se de uma solução estoque em DMF. O coeficiente de absorção molar (ϵ) da ZnPc foi determinado em água deionizada e em etanol, a partir de regressão linear utilizando a Lei de Lambert-Beer (Eq. 14). Os perfis de emissão de fluorescência foram obtidos em etanol e em água, e foram utilizados para posterior determinação de rendimentos quânticos de fluorescência.

3.6.2 Caracterização da quitosana

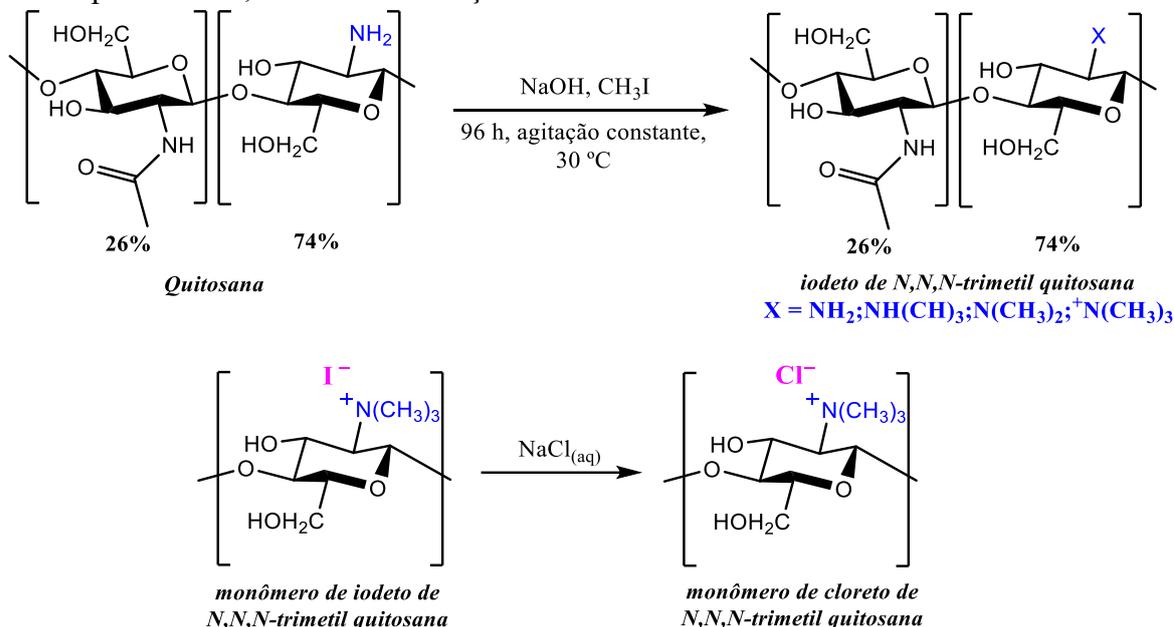
Toda a parte de caracterização físico-química da quitosana, material de partida para a síntese da TMC, encontra-se na Parte I desta Tese, nas seções 2.6.1 e 2.7.1.

3.6.3 Síntese do cloreto de *N,N,N*-trimetil quitosana (TMC)

Para a síntese da *N,N,N*-trimetil quitosana (TMC), inicialmente foi necessário solubilizar a quitosana, e, para isto, 2,0 g de quitosana foram misturados à 200 mL de água deionizada, o pH da mistura foi ajustado para 2,0 utilizando uma solução de HCl 4 mol L⁻¹. Na

sequência, 200 mL de DMF foram adicionados, e o pH foi ajustado para 11,0 com uma solução de KOH 1 M. A mistura permaneceu por 72 h sob agitação constante, apresentando-se como uma solução gelatinosa ao final do processo, com a quitosana solubilizada. A solução foi então transferida para um balão de fundo redondo, e sob agitação constante a 30 °C foram adicionados 0,046 mol de NaOH e, logo após, 0,096 mol de iodeto de metila (CH₃I). O balão foi revestido de papel alumínio para proteção da luz. Após 48 h de reação, uma nova porção de NaOH e CH₃I foi adicionada, e, ao final de 96 h, a reação foi retirada. O excesso de água foi removido em baixa pressão, utilizando um rotaevaporador, e o pré produto, iodeto de *N,N,N*-trimetil quitosana, foi precipitado com 500 mL de etanol gelado, e separado por filtração utilizando um funil de Buchner, apresentando-se na forma de fibras com coloração branca. Para proceder a troca de contra-íon, o iodeto de *N,N,N*-trimetil quitosana foi dissolvido em uma solução aquosa de cloreto de sódio 5% (m/v), para obtenção do produto final, cloreto de *N,N,N*-Trimetil quitosana (TMC), que foi precipitado com 110 mL de acetona gelada, e separado por filtração, que foi armazenado em um dessecador para secagem.[174] O sólido obtido foi macerado e redissolvido em água deionizada (pH 4,5), e a purificação foi feita através de diálise, empregando sacos de diálise com limite de peso molecular (MWCO) de 12.000 Da. Os sacos foram preenchidos com a solução de TMC, amarrados em suas extremidades e imersos em água deionizada por 7 dias, com 3 trocas de água ao dia. A TMC purificada foi liofilizada em um liofilizador Edwards Micro Modulyo. A Figura 37 ilustra a rota sintética da TMC.

Figura 37 – Rota sintética da TMC considerando os diferentes caminhos reacionais possíveis, uma vez que a reação da quitosana com CH_3I pode levar à: mono NHCH_3 , di $\text{N}(\text{CH}_3)_2$ e tri $^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$ alquilação do nitrogênio da amina. A última etapa consiste na troca de contra-íon iodeto para cloreto, levando a formação da TMC.



3.6.3.1 Caracterização físico-química da TMC e determinação de seu grau de quaternização (GQ)

Após a síntese da TMC, análises foram realizadas para verificar em que proporção as alquilações ocorreram e determinar a razão entre as unidades monoméricas presentes na cadeia polimérica. A técnica de RMN de ^1H foi empregada para analisar a composição do polímero, e para calcular dois importantes parâmetros: o grau de quaternização (GQ) e o grau de dimetilação (GDM) da TMC sintetizada. As áreas obtidas pela integração dos sinais presentes no espectro de RMN de ^1H possibilitaram determinar o GQ e o GDM através das Equações 22, 23 e 24. Os seguintes sinais foram considerados: hidrogênios dos grupos metil provenientes dos monômeros acetilados (NHCOCH_3) em 2,10 ppm; hidrogênios dos grupos metil dos monômeros *N*-dimetilados (CH_3)₂ em 3,08 ppm; e hidrogênios dos grupos metil dos monômeros quaternizados (CH_3)₃ em 3,35 ppm.[175], [176]

$$S = \frac{[(\text{CH}_3)_3]}{9} + \frac{[(\text{CH}_3)_2]}{6} + \frac{[(\text{NHCOCH}_3)]}{3} \quad (22)$$

$$GQ (\%) = \left[\frac{(CH_3)_3}{9} \times \frac{1}{S} \right] \times 100 \quad (23)$$

$$GDM (\%) = \left[\frac{(CH_3)_2}{6} \times \frac{1}{S} \right] \times 100 \quad (24)$$

O GDM da TMC também foi determinado através de titulação potenciométrica, dissolvendo-se 11,7 mg de TMC em 20 mL de água deionizada (pH ajustado para 2,0). Com o auxílio de um titulador automático Titronic Universal, a solução titulante de KOH 0,085 mol L⁻¹ foi lentamente adicionada, enquanto o pH foi medido com o auxílio de um leitor de pH HANNA HI 113. A partir do número de mols de monômeros *N*-dimetilados titulados, foi possível determinar o GDM na TMC.[177]

Para confirmar as proporções monoméricas encontradas, uma Análise Elementar foi processada, empregando um Analisador Elementar Perkin Elmer CHNS/O 2400 Serie II, operado com O_{2(g)} como gás de combustão (grau 6,0), He_(g) como gás de arraste (grau 5,0), calibrado com acetanilida. O percentual de C, H e N presente na amostra de TMC foi determinado através de cálculos teóricos, com base inicialmente nos GQ e GDM encontrados pelas técnicas acima citadas, e posteriormente confrontados com os resultados obtidos por Análise Elementar.

3.6.4 Síntese da Bio-TMC

Para a síntese da Bio-TMC, 0,0425 g de TMC foram dissolvidas em 50 mL de tampão MES 0,1 M (pH 5), e mantidos por 24 h sob agitação constante a 27 °C. Paralelamente, em um balão de fundo redondo, em 20 mL de uma mistura de DMSO:água deionizada (3:1) foram adicionados 1×10⁻⁴ mol de biotina, seguidos de 2 × 10⁻⁴ mol de NHS (*N*-hidroxissuccinimida) e de 2×10⁻⁴ mol de EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*-etilcarbodiimida), nesta ordem. Os três componentes foram homogeneizados sob agitação constante durante 30 min, mantidos em atmosfera inerte, utilizando gás argônio, a temperatura ambiente. Na sequência, a solução de TMC em tampão MES foi adicionada gota a gota ao balão, e a reação foi mantida por 24 h. Ao final do procedimento, o produto Bio-TMC foi purificado em sacos de diálise (12.000 Da) e liofilizado.[170]

3.6.5 Síntese do PAIm-12

O polímero PAIm, previamente sintetizado por nosso grupo de pesquisa, foi obtido através da funcionalização do poli (ácido acrílico) com 1-(3-aminopropil)-imidazol, conforme reportado por Giusti et al.[167], contendo grupos imidazol e carboxilato em proporção 1:1. Para a síntese do PAIm-12, através da alquilação do PAIm, 0,5 g de PAIm foram diluídos em 10 mL de DMF. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo, onde 5.33×10^{-4} mol (127 μ L) de 1-bromododecano foram lentamente adicionados. O balão foi imerso em um banho termostaticado de glicerina, a 70 °C, e a reação permaneceu sob agitação constante por 48 h. Após o resfriamento da reação, o solvente foi removido sob baixa pressão (rotaevaporador), e 10 mL de diclorometano foram utilizados para fazer a dissolução do produto. O produto foi, então, extraído com 10 mL de uma solução aquosa de HCl 2 mol L⁻¹. Após evaporação da água, o PAIm-12 apresentou aparência de óleo e coloração amarelada.[178]

3.6.6 Caracterização dos polímeros: TMC, Bio-TMC, PAIm e PAIm-12

Os polímeros sintetizados na Parte II, TMC, Bio-TMC, PAIm e PAIm-12, foram caracterizados por RMN ¹H e FT-IR para elucidação estrutural. Os espectros de RMN ¹H do PAIm e do PAIm-12 foram obtidos utilizando um espectrômetro Bruker AVANCE DRX 200 MHz, enquanto os espectros da TMC e da Bio-TMC foram obtidos em um espectrômetro Bruker AVANCE DRX 400 MHz, que oferece uma melhor qualidade de resolução, e os seguintes parâmetros foram ajustados: pulso de 45°, 10s de relaxamento e 128 acúmulos para cada espectro. Para obtenção dos espectros, as amostras foram dissolvidas em 500 μ L de D₂O, adicionando-se 1-2 gotas de DCl, conforme necessário para ajudar a solubilização. Os espectros de FT-IR foram adquiridos em um espectrofotômetro Bruker Alpha 256 scans, utilizando pastilhas de KBr, as quais foram preparadas utilizando 10 mg das amostras.

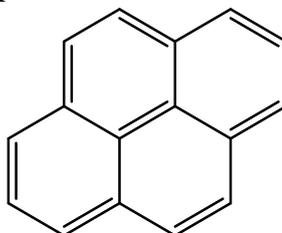
PAIm, PAIm-12 e TMC também foram caracterizados por titulação potenciométrica, utilizando um titulador automático Titronic Universal e um medidor de pH HANNA Instrument HI 113, com solução titulante de KOH 0,085 mol L⁻¹, nos quais 28 mg de PAIm, 45 mg de PAIm-12 e 11,7 mg de TMC foram titulados. Com o número de mols de grupos carboxilato e imidazol titulados, foi possível determinar a fração monomérica de PAIm que foi alquilada no

PAIm-12. Os dados também foram utilizados para determinar os pK_{as} dos polímeros citados, com o auxílio do software CurTiPot.

3.6.7 Medidas de concentração agregacional crítica (cac) e micropolaridade local do PAIm-12

A concentração agregacional crítica (cac) dos agregados de PAIm-12 formados em solução aquosa, em diferentes pHs, foi determinada por emissão de fluorescência, utilizando a sonda fluorescente pireno. Para o pireno, cuja estrutura é mostrada na Figura 38, a razão entre as suas bandas vibrônicas é sensível à polaridade do meio e à formação de ambientes hidrofóbicos.[179] A concentração de pireno empregada nos experimentos foi de 5×10^{-7} mol L⁻¹, estando abaixo da concentração que leva a formação de excímeros em água (2×10^{-6} mol L⁻¹). A excitação foi fixada em 334 nm, com fendas de excitação em 10 nm e de emissão em 2,5 nm. Os espectros de emissão do pireno foram registrados em diferentes pHs: 2,5; 5,5 e 9,0, aumentando-se a concentração de PAIm-12 gradualmente (solução estoque de PAIm-12 em água $4,18 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹). A solução em pH 5,5 foi tamponado com tampão Bis(2-hidroxiethyl)amino-tris(hidroxiethyl)metano (Bis-Tris) e a solução em pH 9,0 foi tamponada com o tampão tris(hidroxiethyl)aminometano (Tris), ambas a 0,1 mol L⁻¹. [180] Durante o experimento, acompanharam-se os efeitos de polaridade dos agregados formados através da razão entre as bandas vibrônicas I e III do pireno, nos comprimentos de onda de 372 e 383 nm, respectivamente. As concentrações críticas foram determinadas a partir da relação entre a intensidade de emissão das bandas I e III (i_I/i_{III}) em função da concentração de PAIm-12 no meio.[181]

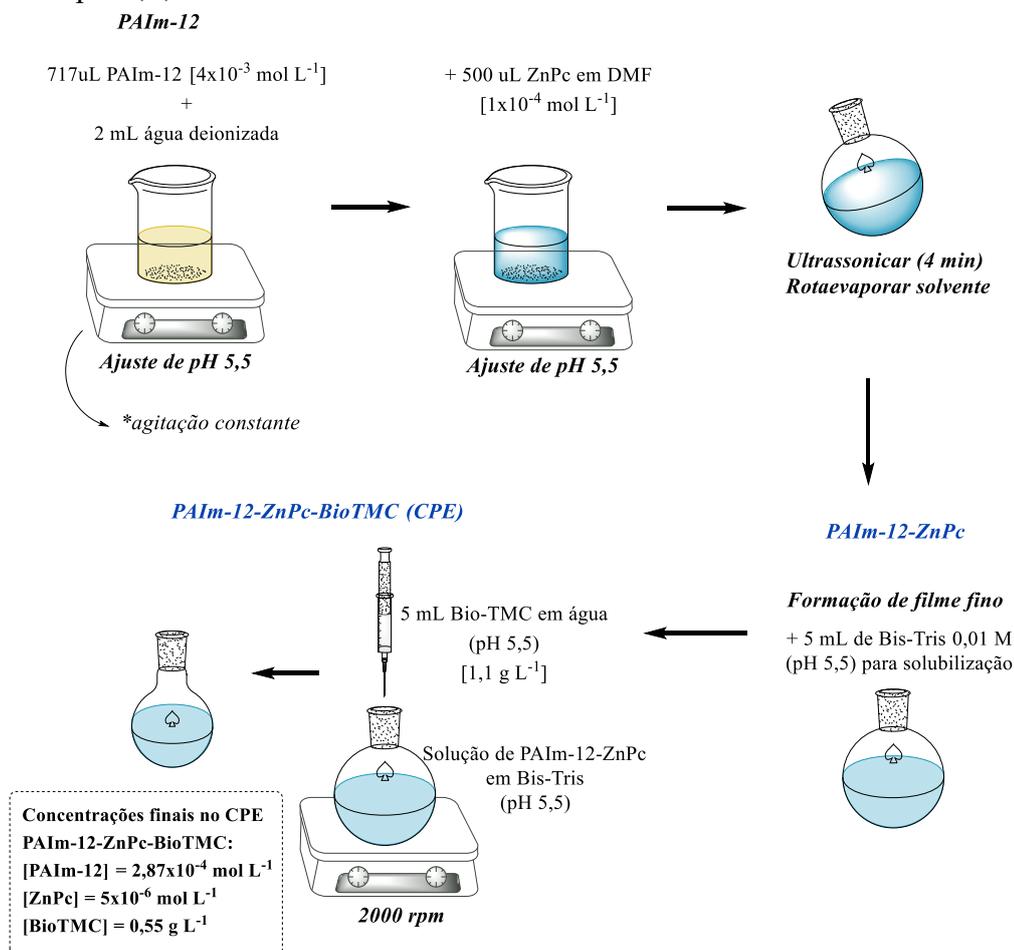
Figura 38 – Estrutura molecular do pireno.



3.6.8 Preparo do complexo polieletrólítico (CPE) carregado com ftalocianina de zinco (ZnPc): PAIm-12-ZnPc-BioTMC

Inicialmente, 3×10^{-6} mol de PAIm-12 dissolvidos em 2,7 mL de água deionizada, foram adicionados a um béquer e o pH da solução foi ajustado para 5,5. Em seguida, 500 μ L de solução estoque de ZnPc em DMF (1×10^{-4} mol L⁻¹) foram adicionados ao sistema, sob agitação, e o pH foi ajustado para 5,5 novamente. A solução foi transferida para um balão de fundo redondo e ultrassonicada por 4 min, e então os solventes foram removidos a baixa pressão, com o uso de um rotaevaporador. A evaporação dos solventes levou a formação de um filme fino de PAIm-12-ZnPc, de coloração azul clara, no fundo do balão. O filme foi dissolvido em 4 mL de tampão Bis-Tris (0,01 mol L⁻¹, pH 5,5), e, a ele, foi adicionado gota a gota uma solução aquosa contendo Bio-TMC (5,5 mg Bio-TMC em 5 mL de água, em pH 5,5), em agitação constante de 2000 rpm, que levou à formação do produto PAIm-12-ZnPc-BioTMC em solução aquosa (pH 5,5). Todo o procedimento foi realizado com as luzes apagadas, buscando a maior proteção possível contra a incidência de luz. A concentração final de ZnPc no sistema é igual a 5×10^{-6} mol L⁻¹. A Figura 39 ilustra o passo a passo da síntese do CPE.

Figura 39 – Passo a passo da síntese do CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC. Todo o processo foi realizado em pH 5,5, no escuro.



3.6.9 Caracterização físico-química do CPE

O Complexo Polieletrólítico (CPE) carregado com ZnPc, PAIm-12-ZnPc-BioTMC, foi caracterizado quanto a sua absorção de luz na região do UV-Vis, com auxílio de um espectrofotômetro Varian Cary 50, de 200 a 800 nm. O espectro de emissão de fluorescência foi obtido com comprimento de onda de excitação fixado em 605 nm; o espectro de excitação foi obtido empregando comprimento de emissão fixo em 700 nm, em temperatura ambiente (25 °C) e fendas de 5 nm. O deslocamento de Stokes ($\Delta\nu$) foi calculado com base na diferença entre os $\lambda_{\text{abs,max}}$ e $\lambda_{\text{emi,max}}$, de acordo com a Equação 16 (vide seção 2.6.6).

Os espectros de absorção de luz e de emissão de fluorescência também foram utilizados para cálculo do rendimento quântico de emissão de fluorescência (ϕ_F), integrando-se a área sob

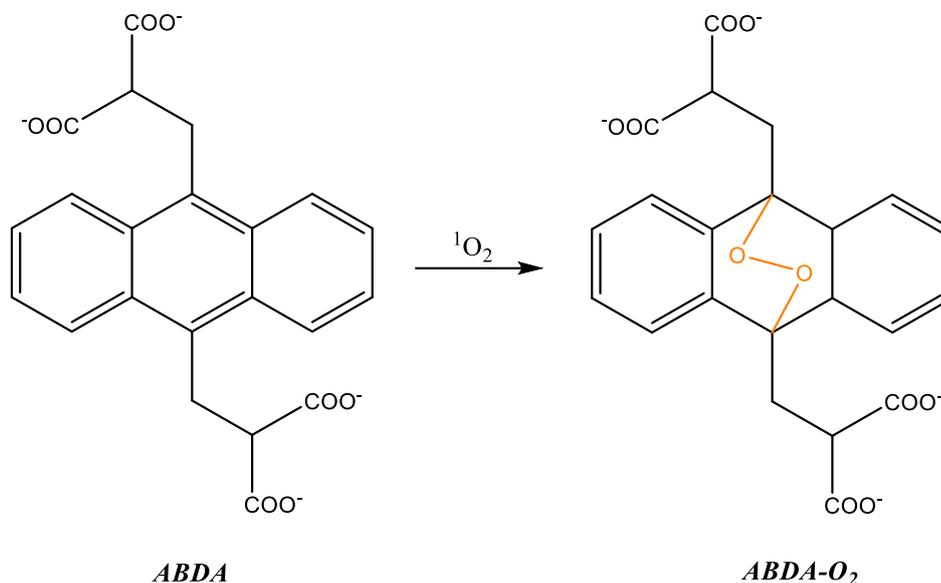
os espectros de emissão e aplicando-as na Equação 15 (seção 2.6.6). Para o cálculo de ϕ_F perante Eq. 15, é necessário que se possua um valor de rendimento quântico padrão (ϕ_R), retirado da literatura, e que, neste caso, foi o da ZnPc em etanol ($\phi_R = 0,53$). [182] A concentração de ZnPc em todas as amostras foi mantida constante e igual a $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. Medidas de tempos de meia vida de fluorescência foram obtidas utilizando o equipamento EasyLife X Espectrômetro de Tempo de Vida de Fluorescência, utilizando um LED monocromático de comprimento de 370 nm e filtro de 380 nm. O tempo de vida (τ) da ZnPc livre em etanol foi comparado ao da ZnPc conjugada ao sistema PAIm-12-ZnPc-BioTMC, o valor de τ foi mensurado a partir do tratamento dos dados com o software Origin. Para investigar a presença de diferentes populações de ZnPc na amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC, iodeto de potássio (KI) foi empregado como agente supressor de fluorescência da ZnPc. Em uma cubeta de quartzo de caminho óptico de 10 mm, alterações na intensidade de emissão de fluorescência de uma amostra de 2,0 mL de CPE ($[\text{ZnPc}] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) foram coletadas à medida em que se adicionaram alíquotas de uma solução de KI 3 mol L^{-1} . A concentração de KI variou de 0 a $5,58 \times 10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$.

Medidas de espalhamento dinâmico de luz foram empregadas para determinar o Potencial Zeta (ζ) e o tamanho hidrodinâmico dos agregados de PAIm-12-ZnPc-BioTMC, por meio do equipamento ZetaSizer Nano ZS da Malvern. Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) foram obtidas através de um microscópio TEM100kV (JEM-1011), utilizadas para estudar a morfologia dos agregados.

3.6.10 Geração de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Para verificar a capacidade da ZnPc em gerar oxigênio singlete na presença de luz, em sua forma livre em etanol e conjugada ao sistema PAIm-12-ZnPc-BioTMC, o substrato ABDA (ácido 9,10-antraceniil-bis(metileno)dimalônico) foi utilizado como sonda. O experimento detecta a capacidade de geração de $^1\text{O}_2$ através de uma medida indireta, uma vez a ABDA é convertida em seu endoperóxido ao reagir com o $^1\text{O}_2$, como mostra a reação na Figura 40, o que causa a redução de sua concentração, que pode ser acompanhada pela redução na absorvância. [183]

Figura 40. Reação de oxidação da sonda ABDA com oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), levando à formação do endoperóxido (ABDA- O_2).



Para o procedimento, um aparato foi montado para que fosse possível realizar iluminação e medidas de absorção UV-Vis simultâneas da amostra contida na cubeta. A cubeta foi posicionada em uma célula do espectrofotômetro, e acima desta, com o auxílio de um suporte e garras, posicionou-se um laser vermelho (660 nm, 100 mW cm^{-2}), que foi utilizado como fonte de luz para excitação da ZnPc contida nas amostras durante todo o experimento. Para as reações, $10 \mu\text{L}$ de uma solução estoque concentrada de ABDA em DMSO ($2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) foram adicionados à cubeta contendo $1,8 \text{ mL}$ de solução de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (ou de ZnPc livre em etanol) e $200 \mu\text{L}$ de água deionizada. A concentração de ZnPc em ambos os experimentos foi de $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, e a de ABDA $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. Com as amostras prontas, a cubeta foi posicionada e o primeiro espectro de absorção UV-Vis foi coletado antes de se dar início a iluminação. A cinética de degradação da sonda ABDA foi acompanhada em 398 e em 377 nm (ZnPc livre) e 404 e 382 nm (ZnPc conjugada), ajustadas a modelos cinéticos de primeira ordem, ou de duas etapas de primeira ordem consecutivas (Equações 20 e 21, seção 2.6.8) (observação: neste caso, B_1 e B_2 são as amplitudes de decaimento da absorção da ABDA).

Uma vez realizado o teste com ABDA e determinada a capacidade de geração de EROs pelo FS, uma investigação mais detalhada dos tipos de EROs geradas pela ZnPc livre e conjugada ao sistema PAIm-12-ZnPc-BioTMC foi realizada. Para tanto, dois agentes supressores foram empregados: azida de sódio (NaN_3), que é supressora de $^1\text{O}_2$ [116], e DMSO,

que é supressor de radical $\bullet\text{OH}$ [148]. O preparo das amostras foi o mesmo do experimento anterior, sendo que para o teste com azida de sódio, 5 uL de ABDA $2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram adicionados ao sistema antes de iniciar a iluminação, totalizando uma concentração final de $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ para a azida. Por outro lado, para o experimento com DMSO, os 200 uL de água deionizada foram substituídos por 200 uL de DMSO, totalizando uma concentração final de 10% DMSO. Para todas as amostras, a concentração de ABDA empregada foi de $1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e de ZnPc (livre ou conjugada) de $4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. As cubetas foram continuamente iluminadas durante todo o experimento e as cinéticas de degradação da ABDA foram acompanhadas em 398 nm para ZnPc livre e 404 nm para ZnPc conjugada.

3.6.11 Cinéticas de fotobranqueamento (FB) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (ϕ_{FB})

A fotoestabilidade da ZnPc livre em etanol e em água, e conjugada ao sistema PAIm-12-ZnPc-BioTMC foi comparada utilizando um laser vermelho (660 nm, 100 mW cm^{-2}) como fonte de iluminação. Em uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, 2 mL de solução aquosa de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (ou 1,95 mL de etanol (ou de água) contendo 43 uL de solução estoque de ZnPc em DMF) foram expostos à iluminação por um período de tempo pré-determinado, e as cinéticas de foto-oxidação da ZnPc foram acompanhadas em 667 nm. A concentração de ZnPc em todas as amostras foi mantida em $2,15 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$. As constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) foram determinadas através das Eq. 19 e 20.

O rendimento quântico de fotobranqueamento (ϕ_{FB}) foi calculado por meio da Equação 25, adaptada de Hadjur et al.[184]

$$\phi_{\text{FB}} = \frac{(A_0 - A)V_S N_A h c}{\varepsilon l \int_0^t \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} P(\lambda) \cdot I_0 (1 - 10^{-bc\varepsilon}) \cdot e^{-k_{\text{FB}} t} d\lambda dt} \quad (25)$$

Onde: V_S é o volume da amostra, N_A é a constante de Avogadro ($6,022 \times 10^{23} \text{ mol}^{-1}$), h é a constante de Planck ($6,626 \times 10^{-34} \text{ J s}$), c é a velocidade da luz no vácuo ($2,997 \times 10^8 \text{ m s}^{-1}$), ε é o coeficiente de absorção molar ($\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), l é o caminho óptico, P é a potência da fonte de luz (mW) e $I_0(1 - 10^{-bc\varepsilon})$ é a intensidade da luz absorvida.[185]

3.6.12 Testes biológicos: avaliação de TFD *in vitro*

3.6.12.1 *Ensaio colorimétrico de Sulforodamina B*

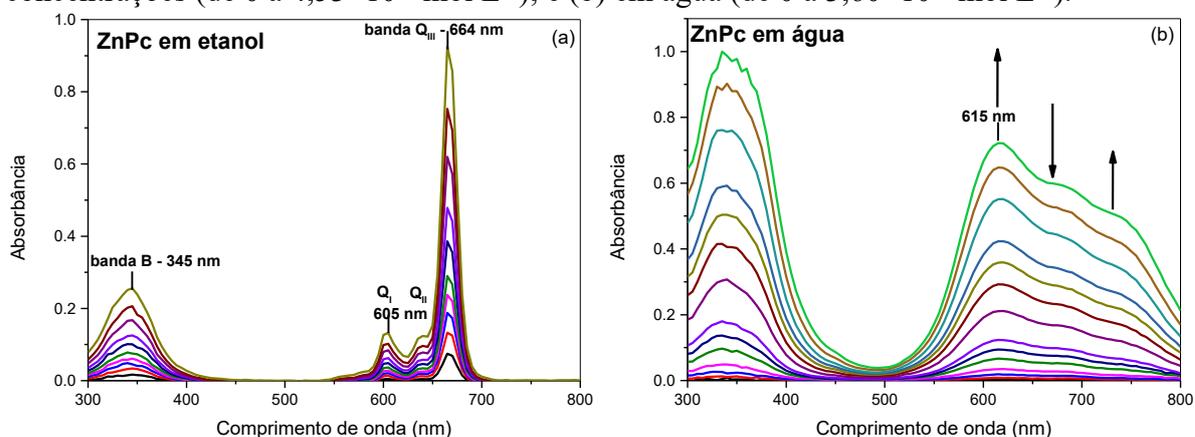
Para determinação da densidade celular o método de ensaio colorimétrico da Sulforodamina B foi utilizado, através da medição do conteúdo de proteína celular. Células de melanoma B16F10 foram plaqueadas em placas de 96 poços (3.000 células/poço) por um período de 24 h. Após, o meio foi trocado e as células foram pré-incubadas com as formulações teste – sendo elas: ZnPc livre em água, PAIm-12-BioTMC e PAIm-12-ZnPc-BioTMC (ou CPE) – em diferentes concentrações por 15 min, seguido de exposição à luz branca ($55,3 \text{ J cm}^{-2}$) por 30 min, empregando um sistema de LED *in vitro* – “Warm White” Número de série LK1490_M006. A exposição à luz foi realizada em uma cabine de segurança biológica a temperatura ambiente ($25 \text{ }^\circ\text{C}$), e as placas controle foram tratadas sob as mesmas condições no escuro. As células foram então incubadas por 24 h em um incubador humidificado a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, e fixadas com $100\mu\text{L}$ de ácido tricloroacético gelado (10%) durante 1 h, em uma temperatura de $4 \text{ }^\circ\text{C}$. As placas foram lavadas com água, secas ao ar durante a noite e coradas com SRB (0,057% SRB em 1% de ácido acético) por 30 min a temperatura ambiente. Após a lavagem com ácido acético 1% para remoção da SRB não ligada, as placas foram secas, e $200\mu\text{L}$ de Tris (pH 10,5) foram adicionados para solubilizar o corante. A absorbância foi medida em 510 nm em um leitor de microplaca. A densidade celular foi calculada como a porcentagem de absorbância comparada com os controles veículo/não tratados.[117]

RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.7.1 Caracterização físico-química do FS Ftalocianina de Zinco (ZnPc)

3.7 As curvas de calibração de absorção de luz UV-Vis foram construídas em água e em etanol, e utilizadas para determinação do coeficiente de absorção molar da ZnPc em ambos os solventes (Apêndice E – Figuras E1 e E2). Os perfis de absorção UV-Vis podem ser observados abaixo, nas Figuras 41 a e b.

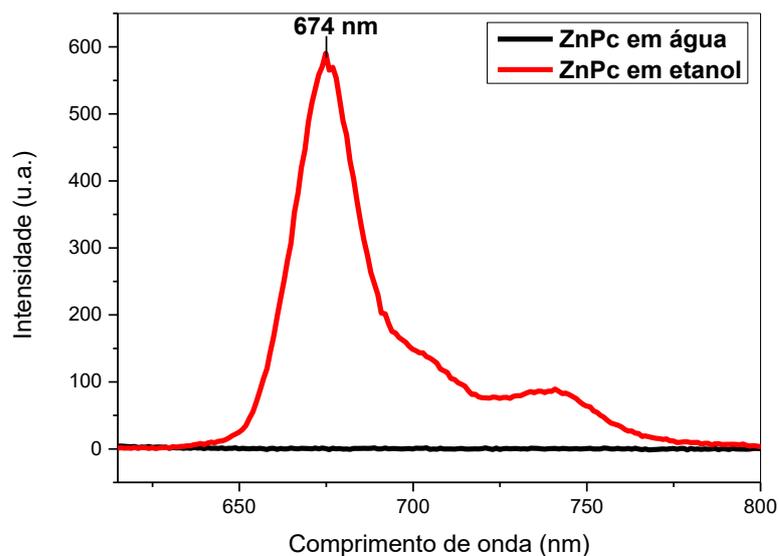
Figura 41 – (a) Espectros de absorção de UV-Vis da ZnPc em etanol em diferentes concentrações (de 0 a $4,53 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹); e (b) em água (de 0 a $3,60 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹).



O espectro de absorção UV-Vis da ZnPc em etanol (Figura 41a) mostra uma banda de intensa absorção de luz em 664 nm, correspondente à banda Q_{III}, originada pelas transições de $S_0 \rightarrow S_1$, bem como uma banda menos intensa e mais ampla em 345 nm, denominada banda B ($S_0 \rightarrow S_2$).[186] O coeficiente de absorção molar da ZnPc em etanol foi determinado em 664 nm ($\epsilon_{\text{ZnPc,etanol},664\text{nm}} = 20,1 \times 10^4$ L mol⁻¹ cm⁻¹) e em 605 nm ($\epsilon_{\text{ZnPc,etanol},605\text{nm}} = 29,1 \times 10^3$ L mol⁻¹ cm⁻¹ (banda Q_I)). Em contrapartida, o espectro de absorção UV-Vis da ZnPc em água mostrou um perfil distinto. Moléculas hidrofóbicas tendem a agregar-se em solução aquosa, e este processo é observado para a ZnPc em água, conforme demonstrado na Figura 41b, em que ocorre uma redução na intensidade de absorção de luz da banda Q_{III} (que, por sua vez, é uma banda indicativa da existência de espécies monoméricas em solução), acompanhada do aparecimento de uma nova banda ampla, em aproximadamente 740 nm. Este tipo de alargamento da banda Q é característico das ftalocianinas que formam agregados em água.[187]

Em resumo, isto significa que em solução aquosa, a maior parte das moléculas de ZnPc encontra-se na forma de agregados, enquanto que em etanol elas estão monomerizadas.[188] Em água, o coeficiente de absorção molar encontrado em 615 nm foi de $\varepsilon_{\text{ZnPc, água, 615nm}} = 2,03 \times 10^4 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

Figura 42 – Espectros de emissão da ZnPc em água (linha preta) e em etanol (linha vermelha). $[\text{ZnPc}] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $\lambda_{\text{excitação}} = 605 \text{ nm}$; fenda 5 nm.



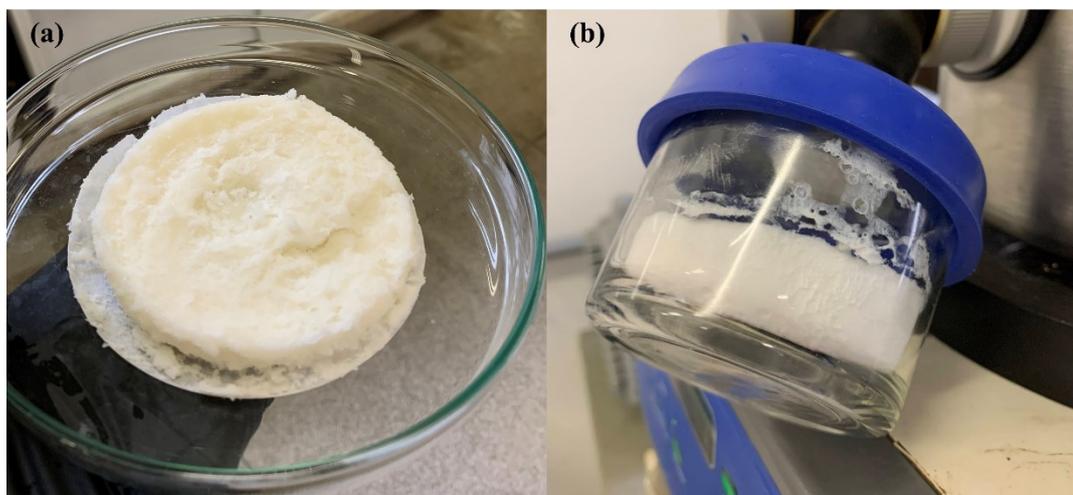
Os espectros de emissão de fluorescência da ZnPc em etanol e água (Figura 42) estão em acordo com o comportamento observado nos perfis de absorção UV-Vis. Em etanol, a ZnPc apresentou emissão de fluorescência com comprimento de onda máximo de 674 nm. Por outro lado, em água, é possível perceber o efeito da agregação das moléculas de ZnPc, que resultou na supressão da emissão de fluorescência.[188] Quando ocorre a agregação das moléculas de FS, a maior parte dos processos radiativos de desativação do estado excitado é suprimida – processo denominado “supressão por agregação”[189], e as moléculas passam pelo processo de desativação a partir de conversão interna. Nesse cenário, os rendimentos quânticos de estado tripleto (ϕ_T) podem ser drasticamente reduzidos, conforme já observado por Gerald J. Smith em 1985, que relatou uma redução de mais de 60% no ϕ_T da hematoporfirina quando em solução aquosa (em relação ao etanol).[190] Essa alteração pode ser uma consequência da interação entre o estados fundamental e o primeiro estado singleto excitado em moléculas adjacentes (dipolos de transição), levando a uma alteração na probabilidade de transições radiativas, conforme demonstrado por Kasha et al. em 1965.[191] Uma segunda forma através da qual a

agregação afeta o rendimento de estado tripleto é pela extinção não-radiativa de seu precursor, o estado excitado singlete, ou seja, aumentando significativamente a probabilidade de conversão interna.[190] Conforme já detalhado, os mecanismos envolvidos na geração de EROs durante a TFD são iniciados quando o FS se encontra no estado tripleto excitado, e é por este motivo que a agregação causada pela água pode prejudicar e até mesmo inviabilizar a aplicação de FS hidrofóbicos em sua forma livre. Daqui, surge a necessidade de encapsulamento dos FS, a fim de que permaneçam em sua forma monomérica fotoativa.

3.7.2 Síntese e Caracterização do cloreto de *N,N,N*-Trimetil quitosana (TMC)

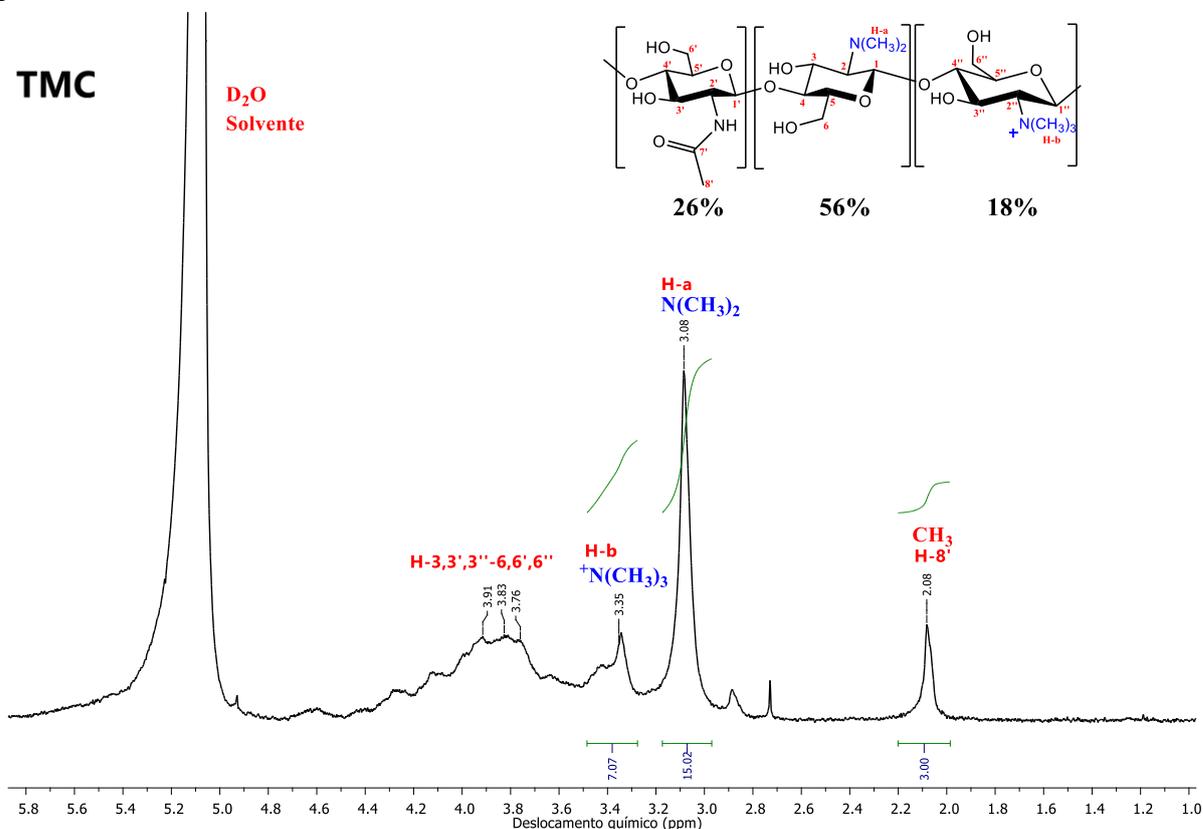
O iodeto de *N,N,N*-trimetil quitosana (Figura 43a) foi obtido a partir da reação entre os grupos amino livres da quitosana e o iodeto de metila, em meio básico, em uma reação de substituição nucleofílica, onde o par de elétrons livre do nitrogênio age como nucleófilo, atacando o carbono eletrofílico do haleto de alquila (CH_3I , eletrófilo). O meio alcalino foi empregado com a função de garantir que os grupos aminos da quitosana permanecessem em sua forma desprotonada, viabilizando a reação. A reação pode acontecer uma, duas ou três vezes em cada nitrogênio, levando a formação de monômeros mono, di e tri substituídos. Após a síntese, procedeu-se a troca de contra íon para obtenção do cloreto de *N,N,N*-Trimetil quitosana, abreviado como TMC, uma vez que o íon cloreto (Cl^-) é menor e mais solúvel em água, em relação ao íon iodeto (I^-).

Figura 43 – Aspecto visual (a) do produto intermediário iodeto de TMC e (b) do produto cloreto de TMC.



Após a liofilização, a TMC apresentou cor branca e textura fibrosa (Figura 43b). Sua formação foi confirmada por RMN de ^1H (Figura 44), comparado ao material de partida (Figura 16a, seção 2.7.1). Os espectros apresentam um sinal comum referente aos hidrogênios metílicos dos monômeros acetilados (H-8'), sendo que a quaternização da quitosana afetou o deslocamento químico (δ) deste sinal, passando de 1,99 ppm (quitosana) para 2,08 ppm (TMC). O aparecimento de um novo sinal no espectro da TMC foi observado, em $\delta = 3,08$ ppm, sinal este que já foi relacionado, em estudos anteriores, aos hidrogênios metílicos ligados à amina terciária dos monômeros dimetilados.[192] O sinal relacionados aos hidrogênios do carbono 2 (H-2, δ 3,10 ppm) no espectro de RMN de ^1H da quitosana não é observado no espectro da TMC, e uma hipótese é a ocorrência de uma sobreposição com o sinal anteriormente mencionado.[193] O sinal que aparece em δ 3,35 ppm foi atribuído aos prótons presentes no nitrogênio dos grupos amino dos monômeros trimetilados [$^+\text{N}(\text{CH}_3)_3$].[194] Na região entre δ 3,6 e 4,6 ppm, há diversos sinais sofrendo sobreposição, resultando em uma baixa resolução e impossibilidade de identificação individual dos sinais. Para determinar a composição e os tipos de monômeros formados na TMC, resultantes das substituições nucleofílicas, o grau de dimetilação (GDM) e o grau de quaternização (GQ) foram determinados através das Equações 22, 23 e 24, e foram encontrados os percentuais de 18 e 56%, respectivamente, somando 100% considerando-se as unidades acetiladas restantes.

Figura 44 – Espectro de RMN de ^1H da TMC, com destaque no canto superior direito para as proporções entre os monômeros que a compõe, mostrando que a cadeia polimérica é composta por 56% de monômero dimetilado, 18% de monômero quaternizado e pelos 26% de monômero acetilado originários. Os percentuais foram posteriormente confirmados por titulação potenciométrica e análise elementar.



Os espectros de FT-IR (Figura 45) mostraram as bandas características dos polissacarídeos, na região de 898 e 1155 cm^{-1} , este último relacionado às vibrações assimétricas axiais das pontes C-O-C.[195] Em 1080 cm^{-1} (1070 cm^{-1} para TMC) e 1034 cm^{-1} aparecem as bandas referentes a vibração axial das ligações C-O de álcoois primários.[176] Em 1656 cm^{-1} tem-se a banda correspondente a vibração axial C=O das amidas I, em 1560 cm^{-1} vibração angular N-H da amida II, e em 1320 cm^{-1} vibração axial C-N da amida III, provenientes do monômero acetilado presente na quitosana e na TMC.[124] As bandas em 1380 e 1420 cm^{-1} estão relacionadas à deformação angular simétrica dos grupos metil e metileno, respectivamente. Adicionalmente, a banda que aparece em 1600 cm^{-1} se refere à vibração angular N-H de aminas primárias. É interessante notar que, no espectro da TMC a referida banda desapareceu, indicando que as unidades monoméricas de quitosana contendo grupos amino livres foram completamente alquiladas durante a síntese da TMC, não restando

monômeros com grupos amino primários em sua composição.[196] Para finalizar, uma nova banda em 1463 cm^{-1} apareceu no espectro da TMC, e foi atribuída à vibração axial assimétrica da ligação C-H de grupos metílicos. Tal banda é característica de sais quaternários de quitosana, confirmando a formação da TMC.[195]

Figura 45 – Espectros de infravermelho, em ampliação (de 2000 a 500 cm^{-1}), da quitosana (a) e da TMC (b).

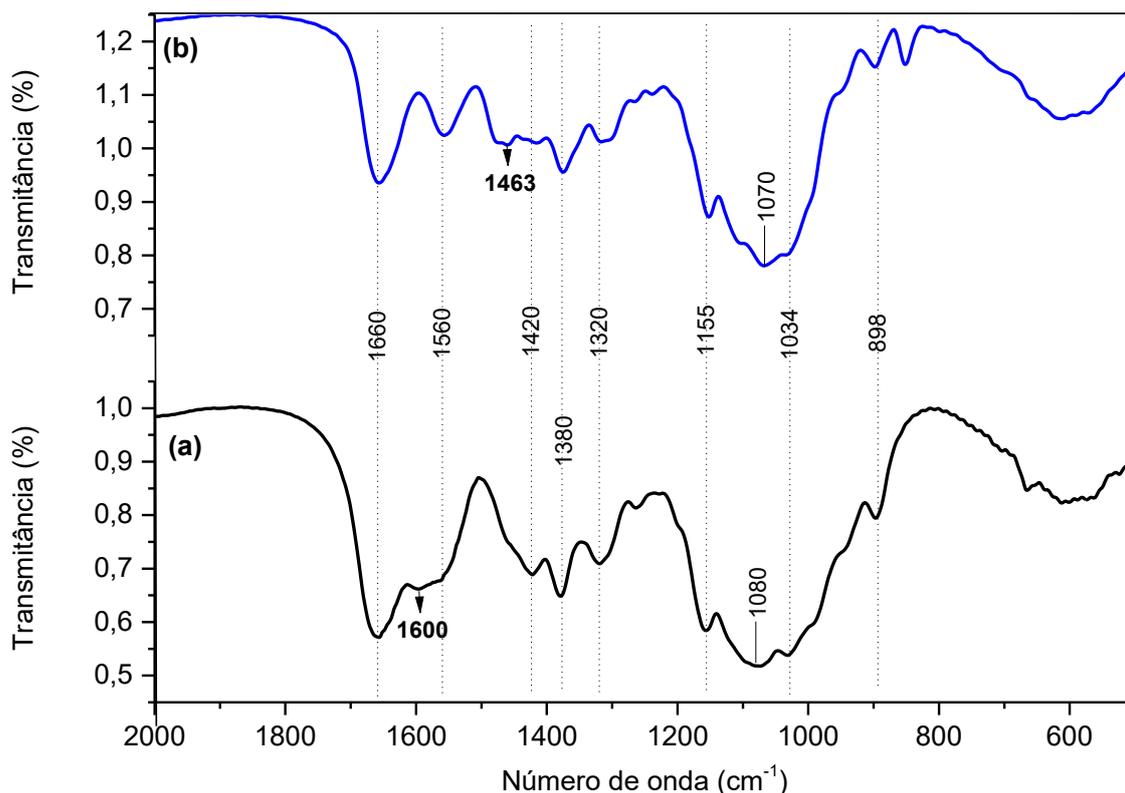
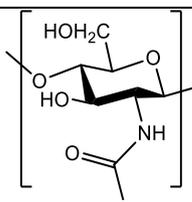
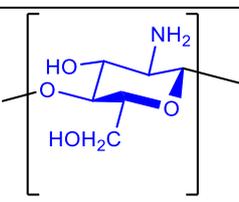
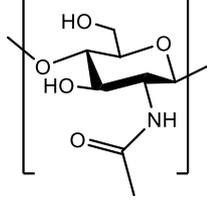
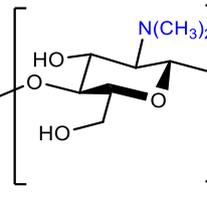
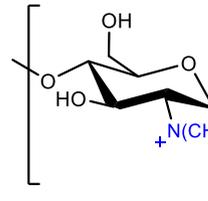


Tabela 5 - Comparação entre os percentuais de C, H e N presentes nas amostras de (a) quitosana e (b) TMC, calculados teoricamente e determinados experimentalmente através de análise elementar.

(a)	Quitosana			
			Total calculado (%)	Total experimental (%)
	26 %	74 %		
C (%)	47,29	44,72	45,39	42,01

H (%)	6,45	6,88	6,77	7,10
N (%)	6,89	8,69	8,22	7,50
C/N	-	-	5,52	5,60

(b)	TMC				
				Total calculado (%)	Total exp. (%)
	26 %	56 %	18 %		
C (%)	47,29	50,78	52,93	50,26	40,90
H (%)	6,45	7,99	8,88	7,75	7,33
N (%)	6,89	7,40	6,86	7,17	5,95
C/N	-	-	-	7,00	6,87

Os parâmetros de GDM e GQ foram confirmados a partir dos dados obtidos através de análise elementar (Tabela 5). Corroborando com os dados obtidos por RMN ^1H , o valor de 56% foi encontrado para o GDM e o valor de 18% para o GQ. Os percentuais, em massa, de C, N e H encontrados experimentalmente para a TMC ficaram próximos àqueles determinados matematicamente (Tabela 5b), apresentando deslocamento negativo de aproximadamente 18% para C e N, e de 5% para H, que pode estar associado à presença de água na amostra. Ainda que os percentuais obtidos experimentalmente para a TMC sejam ligeiramente inferiores aos calculados, a proporção entre a percentagem de C e N permaneceu constante nos dois casos ($C/N \approx 7$). Além disso, em comparação à quitosana (Tabela 5a), houve um aumento da proporção C/N de 5,6 para 6,8 na TMC, estando em acordo com a maior quantidade de átomos de carbono presentes no produto alquilado.

Para elevar ainda mais a confiabilidade dos resultados, o GDM também foi acessado por titulação potenciométrica (Figura 46), e, considerando que a quantidade de matéria de base consumida era equivalente à quantidade de matéria de monômeros dimetilados titulados, encontrou-se um valor de GDM igual a 57%. A titulação da TMC revelou um pK_a em 6,3, que é equivalente ao pH da quitosana[197], e foi atribuído à amina terciária das unidades

dimetiladas. Por fim, a proporção entre as unidades monoméricas da TMC foi estabelecida conforme Figura 47.

Figura 46 – Titulação potenciométrica de 11,7 mg de TMC com KOH 0,085 mol L⁻¹, com notação do pK_a.

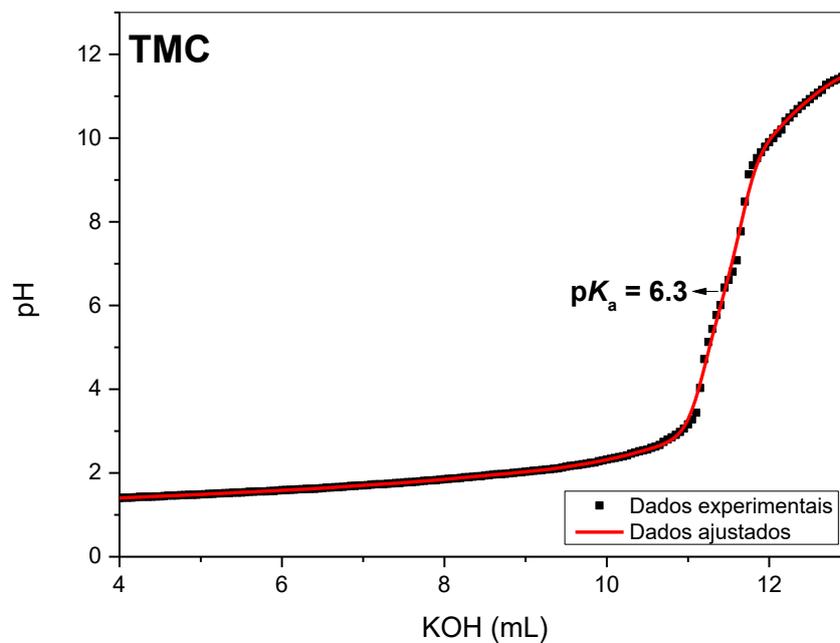
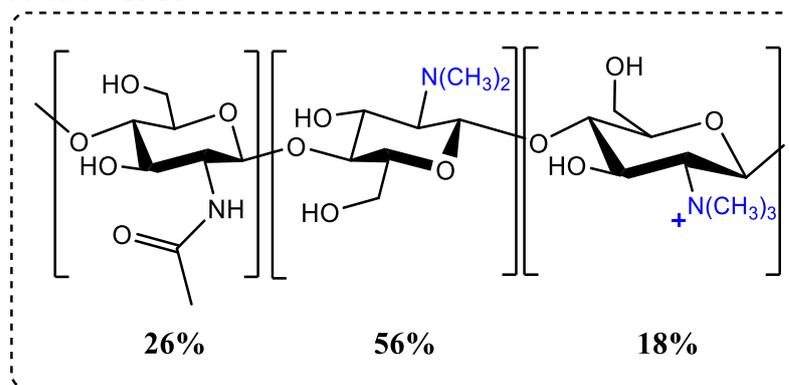


Figura 47 – Estrutura da TMC.

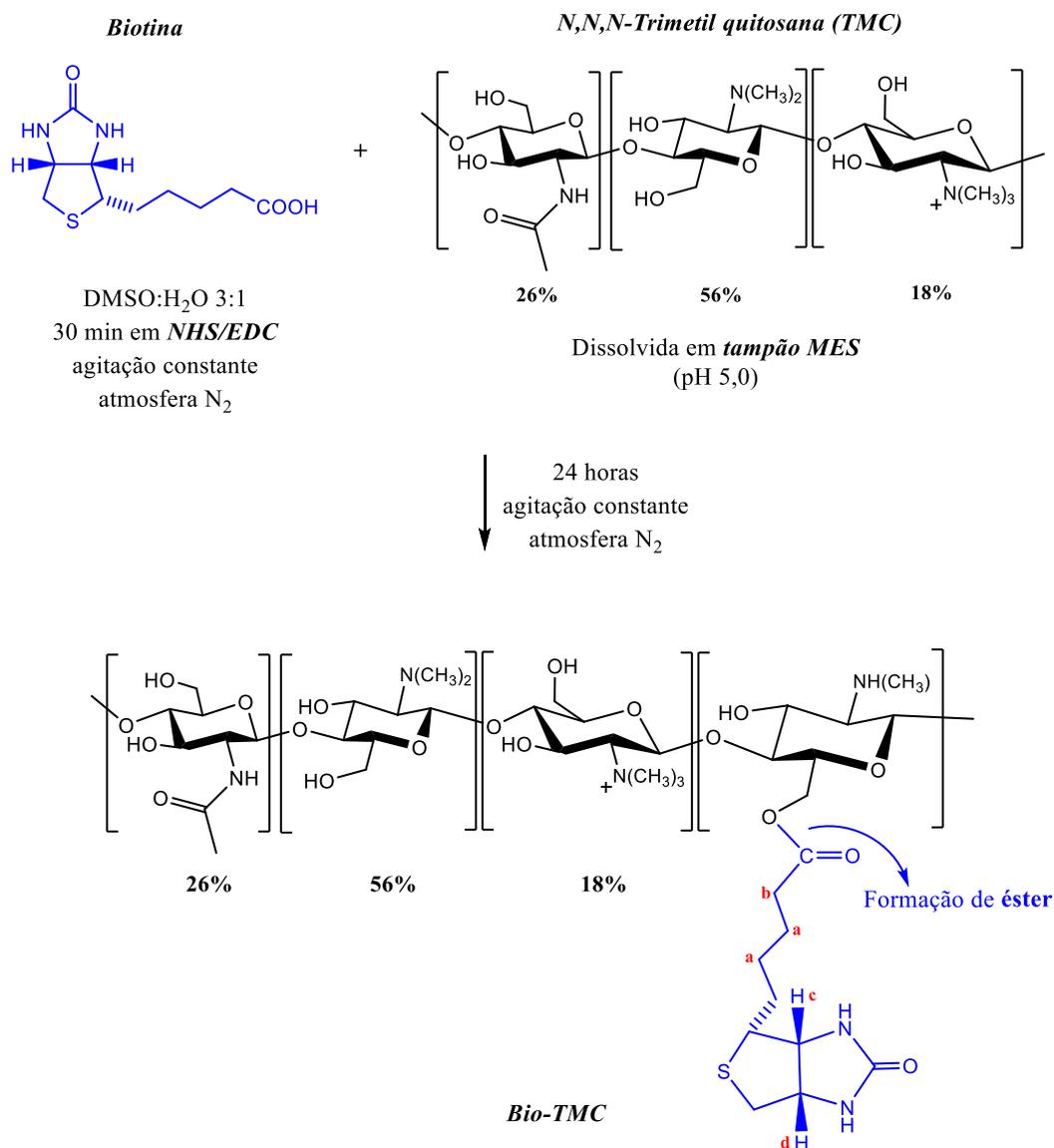


Uma vez tendo sido bem-sucedida a síntese do polímero catiônico, a etapa seguinte consistiu na funcionalização deste com biotina.

3.7.3 Caracterização da TMC funcionalizada com biotina (Bio-TMC)

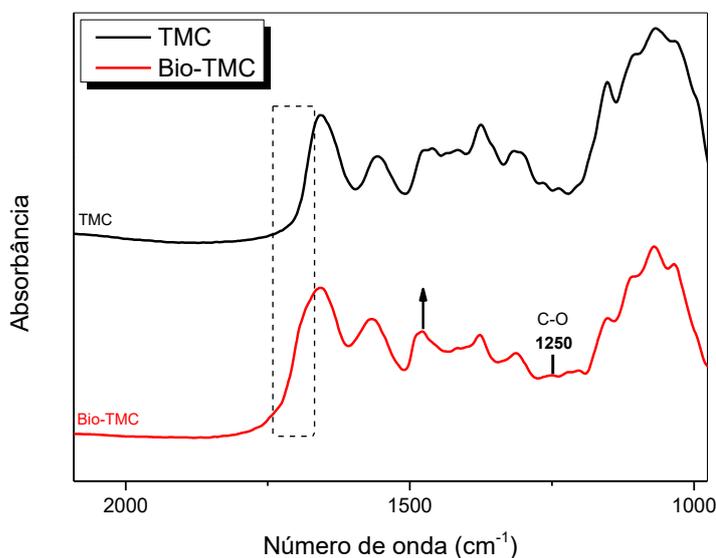
Considerando que o objetivo primordial da síntese da TMC foi a sua aplicação, como um polímero catiônico, na construção do complexo polieletrólítico (CPE), destinado ao encapsulamento do FS ZnPc para aplicações biológicas, optou-se por funcionalizá-la com biotina, a fim de promover um aumento da internalização celular, pensando, é claro, em futuras aplicações biológicas *in vivo*.

Figura 48 – Esquema de síntese da Bio-TMC, a partir da TMC, empregando biotina e o agente ativadores NHS e EDC. A reação leva à formação de uma nova ligação éster.



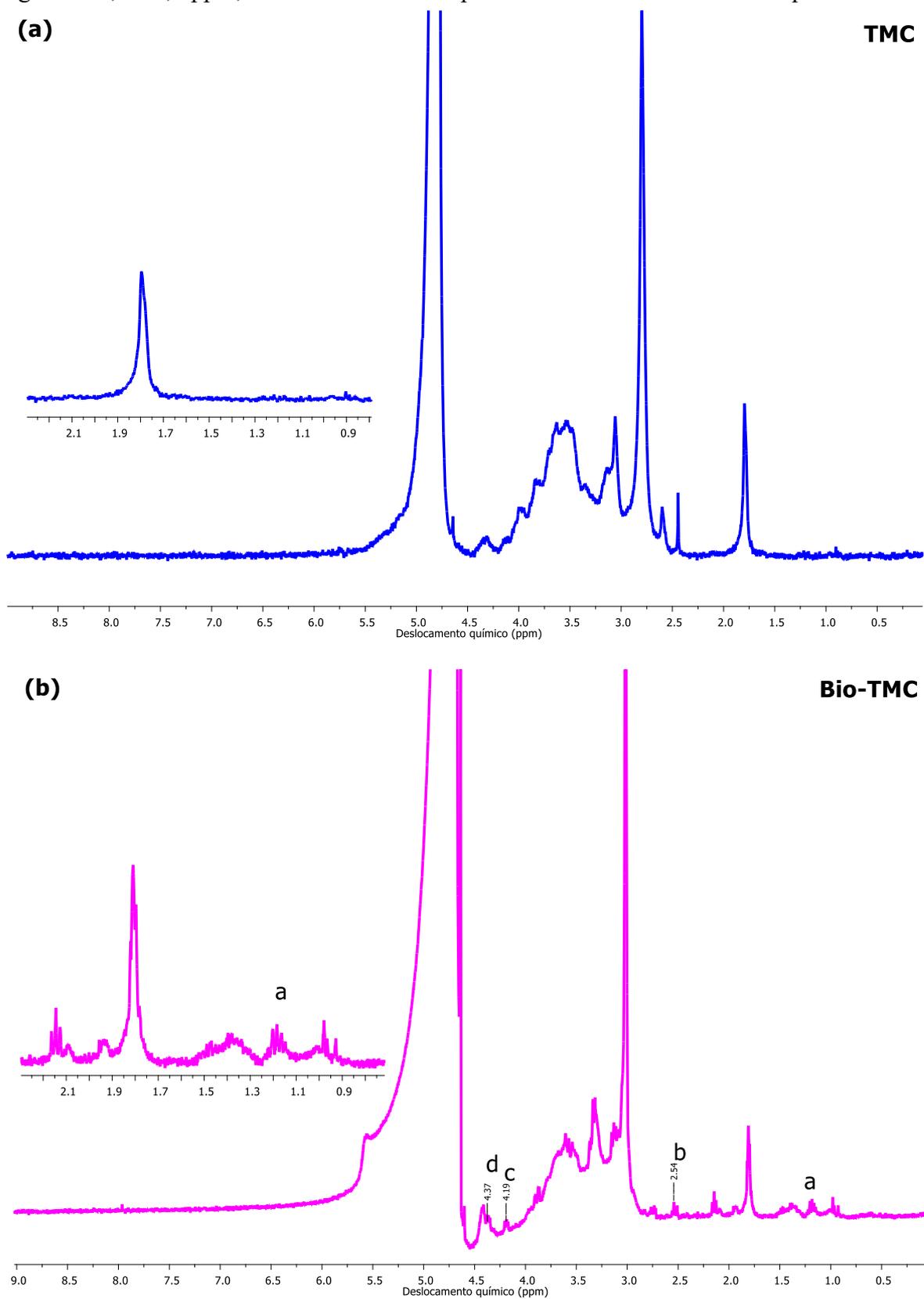
A Bio-TMC foi sintetizada através da “química da carbodiimida”, através de uma reação entre os grupos carboxila da biotina e os grupos hidroxia da TMC. A reação foi mediada pelos ativadores NHS (*N*-hidroxissuccinimida) e EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N*'-etilcarbodiimida), assim como mostra a Figura 48.[173] Sua formação foi avaliada por IV e RMN ¹H. O espectro de FT-IR da TMC já foi detalhado na seção anterior, e mostrou-se muito similar ao da Bio-TMC, com algumas distinções. Como se pode verificar na Figura 49, há um leve alargamento da banda em torno de 1740 cm⁻¹, que corresponde à função éster, acompanhado de um leve aumento de intensidade de absorção em 1250 cm⁻¹, relacionado à vibração da ligação C-O de ésteres.

Figura 49 - Espectros de IV para TMC (preto) e BioTMC (vermelho), em ampliação a região entre 2090-980 cm⁻¹.



Os espectros de RMN ¹H da TMC e da Bio-TMC estão expostos na Figura 50 para fins de comparação. Identificou-se o aparecimento de novos picos que são característicos da estrutura da biotina no espectro da Bio-TMC (Figura 50b). A atribuição dos novos sinais segue: prótons metilênicos de 1,0 a 1,5 ppm (a, equivalentes a 6H) e em 2,54 ppm (b, equivalentes a 2H); dois prótons metínicos em 4,19 ppm (c, 1H) e em 4,37 ppm (d, 1H).[170], [198]

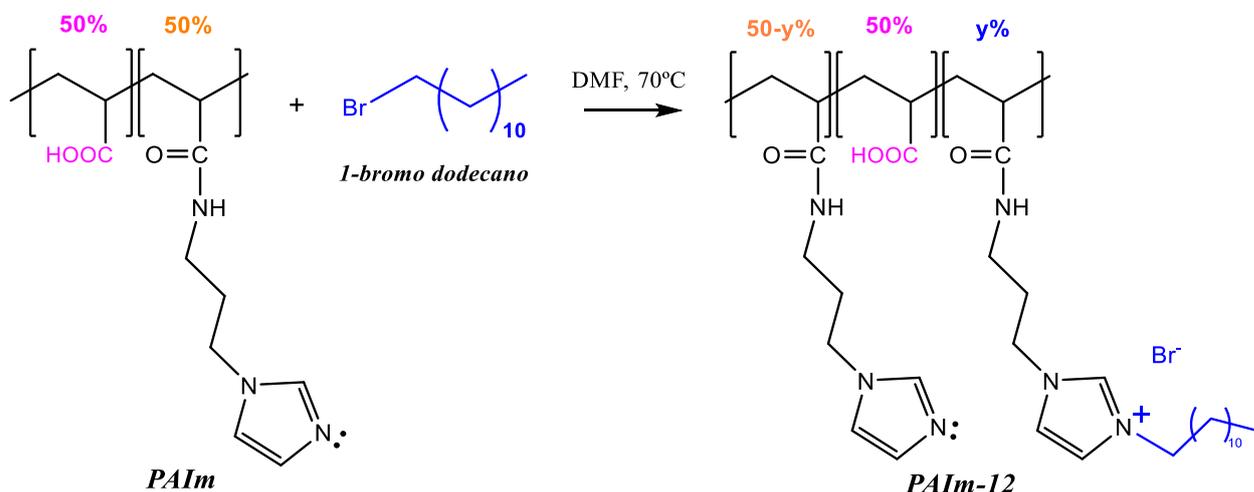
Figura 50 – Espectros de RMN de ^1H da (a) TMC e da (b) Bio-TMC, com destaque para a região de 0,9 a 2,2 ppm, onde é observado o aparecimento dos sinais em destaque.



3.7.4 Caracterização do PAIm-12

O polímero PAIm-12 foi obtido através da alquilação do PAIm, empregando 1-bromododecano, assim como mostra a Figura 51. Conforme já investigado em outros estudos[167], o PAIm possui grupos carboxilatos e imidazóis em mesma proporção (50%/50%). A reação se dá no monômero que contém o grupo imidazol, restando os monômeros com grupo carboxilato inalterados.

Figura 51 – Síntese do PAIm-12, a partir do PAIm. O PAIm é obtido a partir da funcionalização do poliácido acrílico com com grupos imidazóis, conferindo uma proporção 1:1 entre grupos ácido carboxílico e imidazol à estrutura final do PAIm. O PAIm-12, por sua vez, é resultado da alquilação do PAIm, com 1-bromo dodecano.



Os espectros de RMN ^1H do PAIm e do PAIm-12 são mostrados nas Figuras 52 e 53, respectivamente. O espectro do PAIm mostra os sinais característicos dos componentes da estrutura do polímero, onde se pode observar os prótons do anel aromático de imidazol em 7,53 e 8,81 ppm (3H: a, b, c), bem como os prótons metilênicos da amida substituída em 3,34, 3,74 e 4,29 (6H: d, e, f). Também pode-se visualizar os prótons da estrutura da cadeia polimérica, os prótons metínicos em 3,19 e 2,22 ppm (2H, g, i) e os prótons metilênicos em 2,13 ppm (2H, h). O espectro de RMN ^1H do PAIm-12, assim como esperado, é consistente com o espectro do PAIm-12, com um perfil muito semelhante, mostrando, no entanto, um aumento na intensidade dos picos referentes à prótons metilênicos em 1,20 ppm, evidenciando a alquilação do imidazol.

Figura 52 – Espectro de RMN ^1H 200 MHz do PAIm (ppm): 7.53, 2H (a,b); 8.81, 1H (c); 4.29, 2H (d); 3.34, 2H (e); 3.74, 2H (f); 3.19, 1H (g); 2.13, 2H (h); 2.22, 1H (i).

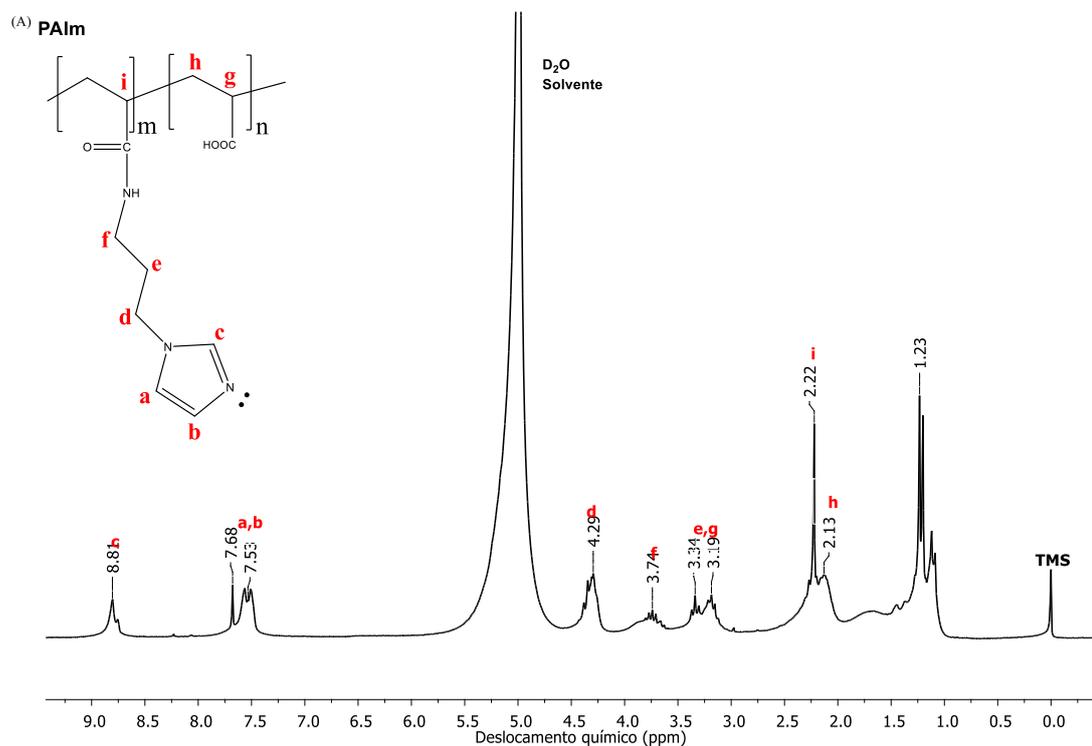
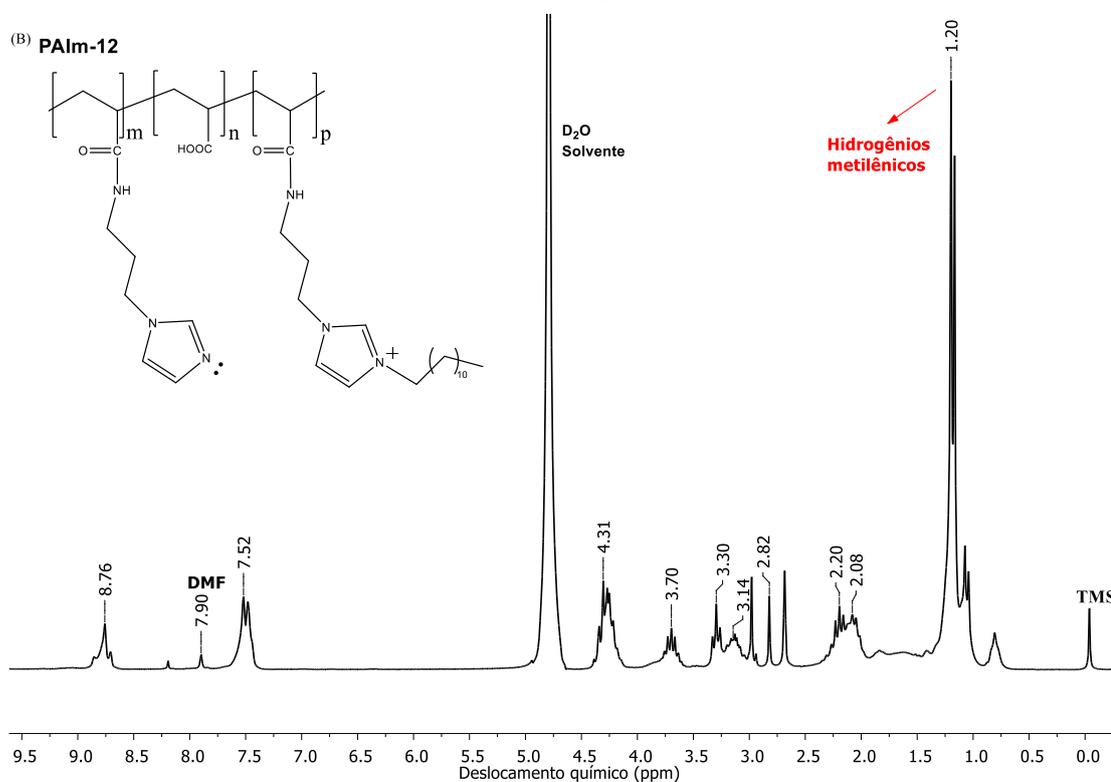
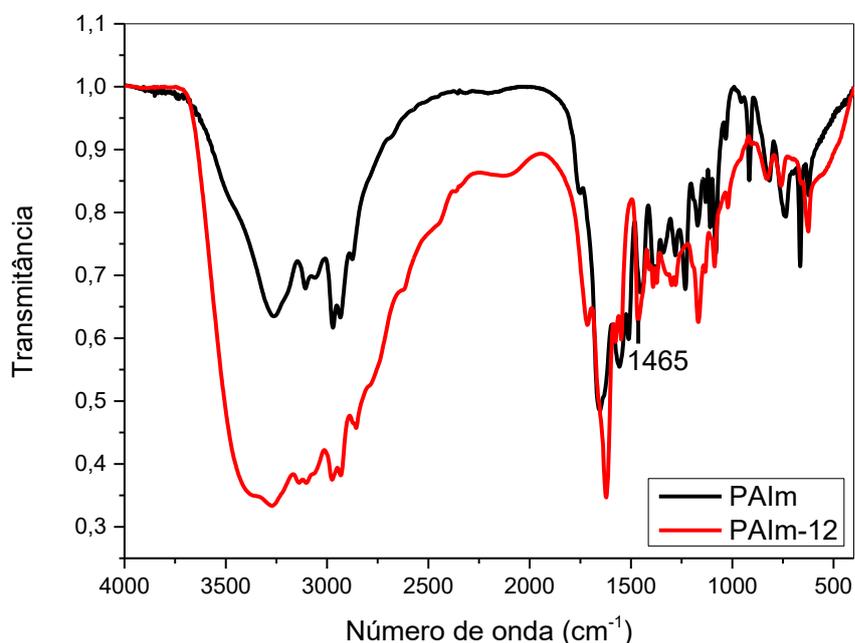


Figura 53 - Espectro de RMN ^1H 200 MHz do PAIm-12 (ppm): 7.52, 2H (a,b); 8.76, 1H (c); 4.31, 2H (d); 3.30, 2H (e); 3.70, 2H (f); 3.14, 1H (g); 2.08, 2H (h); 2.20, 1H (i).



Os espectros de infravermelho também foram realizados, e estão dispostos na Figura 54. Nestes, destaca-se: banda intensa na região de 3300 cm^{-1} , relativa ao estiramento da ligação N-H presente na amida, a banda em questão encontra-se fortemente alargada pelo estiramento da ligação O-H, derivada dos grupos ácido carboxílico presentes na estrutura dos polímeros. A banda em torno de 1620 cm^{-1} também é derivada de ambas as funções, amida e ácido carboxílico, correspondente ao estiramento da ligação C=O. A banda em questão apresenta perfil de um único pico, característico de amidas secundárias, como é o caso do PAIm e do PAIm-12. As bandas que aparecem na região de 3100 e 3130 cm^{-1} são referentes ao estiramento C-H de carbonos do tipo sp^2 , derivados do anel imidazol. Os picos presentes na região de 2975 a 2851 cm^{-1} e em 1465 cm^{-1} indicam, respectivamente, a presença de estiramento C-H e de vibração angular C-H de carbono do tipo sp^3 (alcanos). A banda em 1465 cm^{-1} sofre um aumento de intensidade, relativo a maior quantidade de carbonos sp^3 presentes do derivado alquilado PAIm-12.

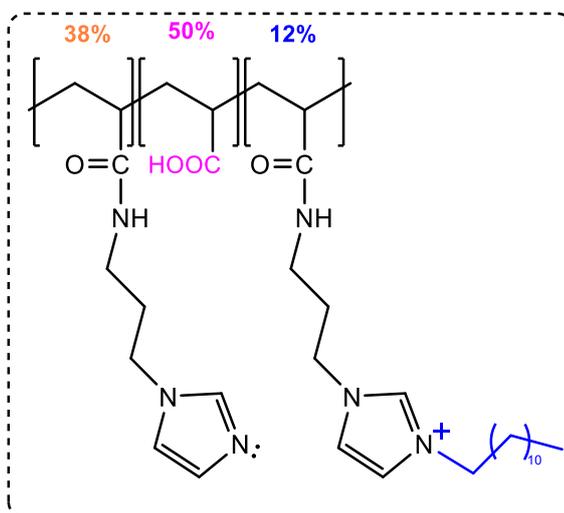
Figura 54 - Espectro de infravermelho do PAIm (linha preta) e do PAIm-12 (linha vermelha).



Para verificar a proporção em que a alquilação ocorreu, titulações potenciométricas foram realizadas, considerando-se que dos três monômeros presentes no PAIm-12, dois são tituláveis: aquele que contém o grupo carboxilato e aquele que contém o grupo imidazol não

alquilado. Com os dados obtidos durante a titulação potenciométrica do PAIm, percebeu-se que o número de mols de carboxilato titulados ($1,29 \times 10^{-4}$ mol) era praticamente o mesmo do de imidazol ($1,31 \times 10^{-4}$ mol), confirmando a proporção 1:1. Por outro lado, para o PAIm-12 obteve-se uma redução significativa no número de mols de grupos imidazol titulados ($1,08 \times 10^{-4}$ mol), indicando que a reação de substituição ocorreu neste monômero. Com estes dados, a partir de cálculos estequiométricos, foi possível determinar que 12% dos monômeros contendo grupo imidazol foram alquilados, restando, então, 38% de monômeros com grupo imidazol livre (Figura 55).

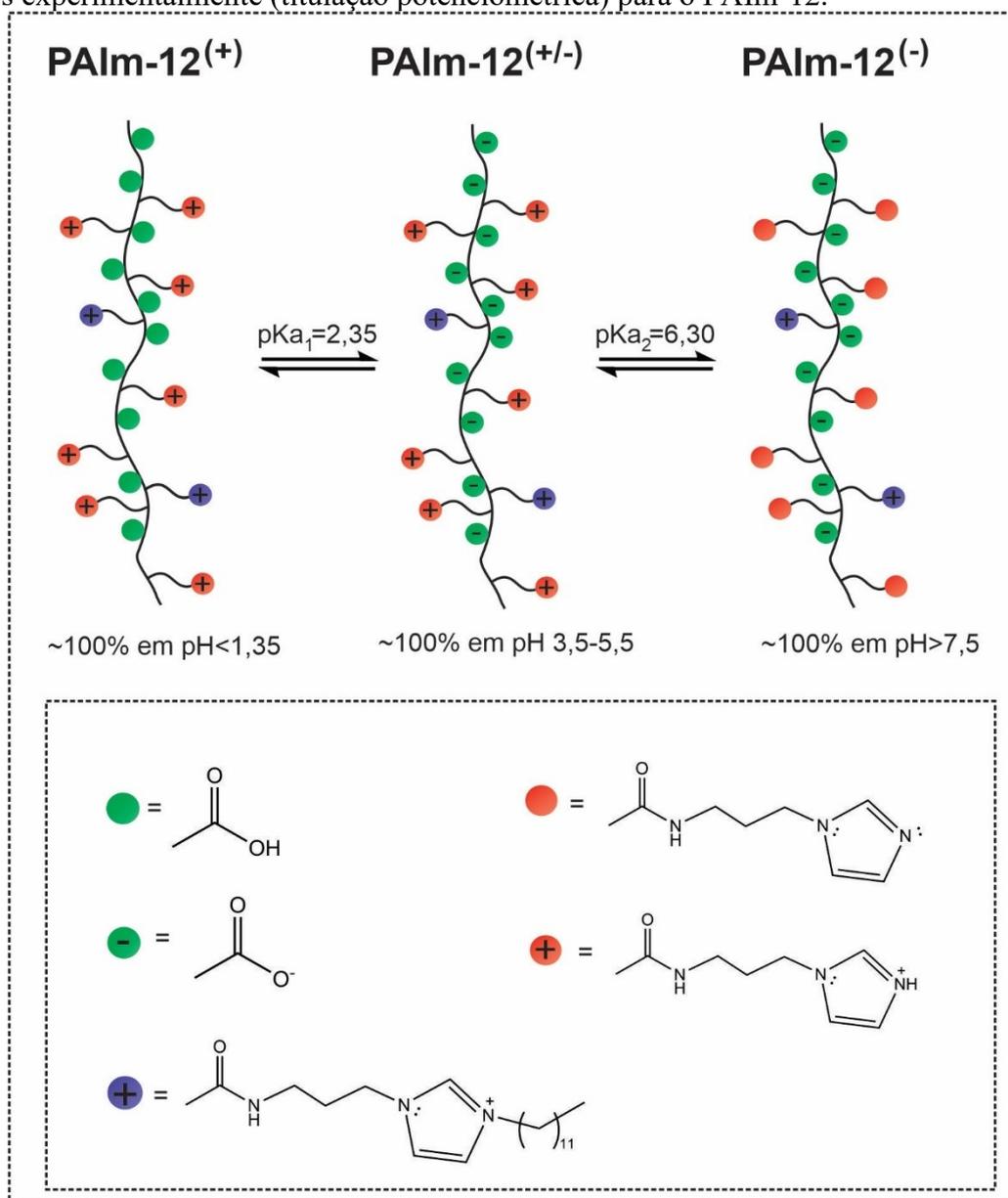
Figura 55 – Estrutura polimérica do PAIm-12, composto em 50% de monômeros com grupo carboxilato, 38% de monômeros com grupo imidazol livre e 12% com grupos de imidazol alquilado.



As titulações potenciométricas também trouxeram informações a respeito dos pK_a s dos polímeros, e os valores encontrados mostraram-se similares àqueles reportados na literatura. As curvas de titulação para o PAIm e para o PAIm-12 estão expostas na Figuras F 1 do Apêndice F. Para o PAIm, o pK_a de aproximadamente 2,5 foi obtido para o grupo carboxilato, e de 6,6 para o grupo imidazol. Por outro lado, para o PAIm-12 os pK_a s de 2,3 e 6,3 foram obtidos para os grupos carboxilato e imidazol, respectivamente. A alteração nos pK_a s pode estar relacionada com uma mudança de ambiente dos grupos carboxilato e imidazol acarretada pela alquilação de uma parte da cadeia polimérica. A Figura 56 sumariza as estruturas de equilíbrio ácido-base do PAIm-12 em diferentes pHs, sendo que, em pH inferior a 1,35 temos uma cadeia prevalentemente catiônica (PAIM-12⁺), entre pH 3,5 e 5,5 uma cadeia zwitteriônica (PAIM-

12^{+}) e em pH acima de 7,5 temos uma cadeia prevalentemente aniônica (PAIM-12 $^{-}$). Para a síntese do CPE, definiu-se trabalhar em pH 5,5, afim de empregar-se a cadeia zwitteriônica, uma vez que esta estrutura contém as cargas negativas necessárias para a interação eletrostática com as cadeias de BioTMC e, ainda, possui cargas positivas residuais que podem conferir à superfície do complexo potencial Zeta positivo, que contribuiria para a estabilização do mesmo.

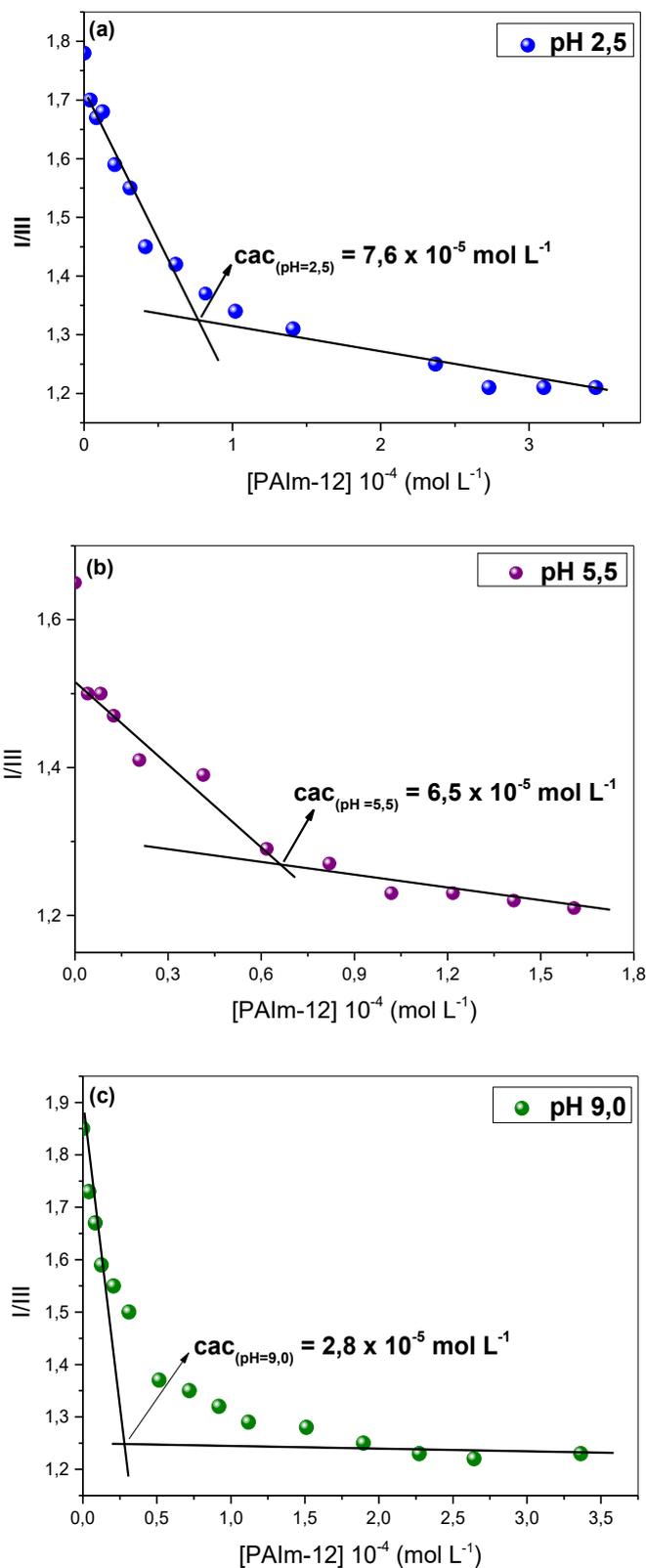
Figura 56 – Equilíbrios ácido-base e espécies prevalentes em cada pH, de acordo com os pK_a s obtidos experimentalmente (titulação potenciométrica) para o PAlm-12.



3.7.5 Determinação da concentração agregacional crítica (cac) do PAIM-12

Os espectros de emissão de fluorescência da sonda pireno foram determinados na presença de diferentes concentrações de PAIm-12, afim de obter-se informações sobre a concentração agregacional crítica (cac) do polímero, em diferentes pHs: 2,5, 5,5 e 9,0. Os perfis de emissão do pireno encontram-se dispostos na Figura G 1 (Apêndice G). Para o pH de 5,5, observou-se a formação de uma intensa banda de excímero (Figura G 1b), ocasionada pela presença do tampão Bis-tris no meio. A partir da razão entre os máximos de emissão gerados pelas bandas I e III do pireno, foi possível plotar os perfis de acordo com a concentração de PAIm-12, como mostra a Figura 57. Como se pode perceber, há uma tendência para que a cac se reduza à medida em que o pH do meio aumenta, sendo que em pH 9,0 o menor valor de cac foi encontrado ($2,8 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$), enquanto em pH 2,5 o maior valor é destacado ($7,6 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). Já no pH intermediário de 5,5, uma cac de $6,5 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ foi determinada.

Figura 57 – Plote da razão entre a intensidade de emissão das bandas I e III do pireno em razão da concentração de PAIm-12, em pH 2,5 (a); 5,5 (b) e 9,0 (c). [pireno] = 5×10^{-7} mol L⁻¹.



3.7.6 Obtenção e caracterização do complexo polieletrólítico carregado com ZnPc: PAIm-12-ZnPc-BioTMC

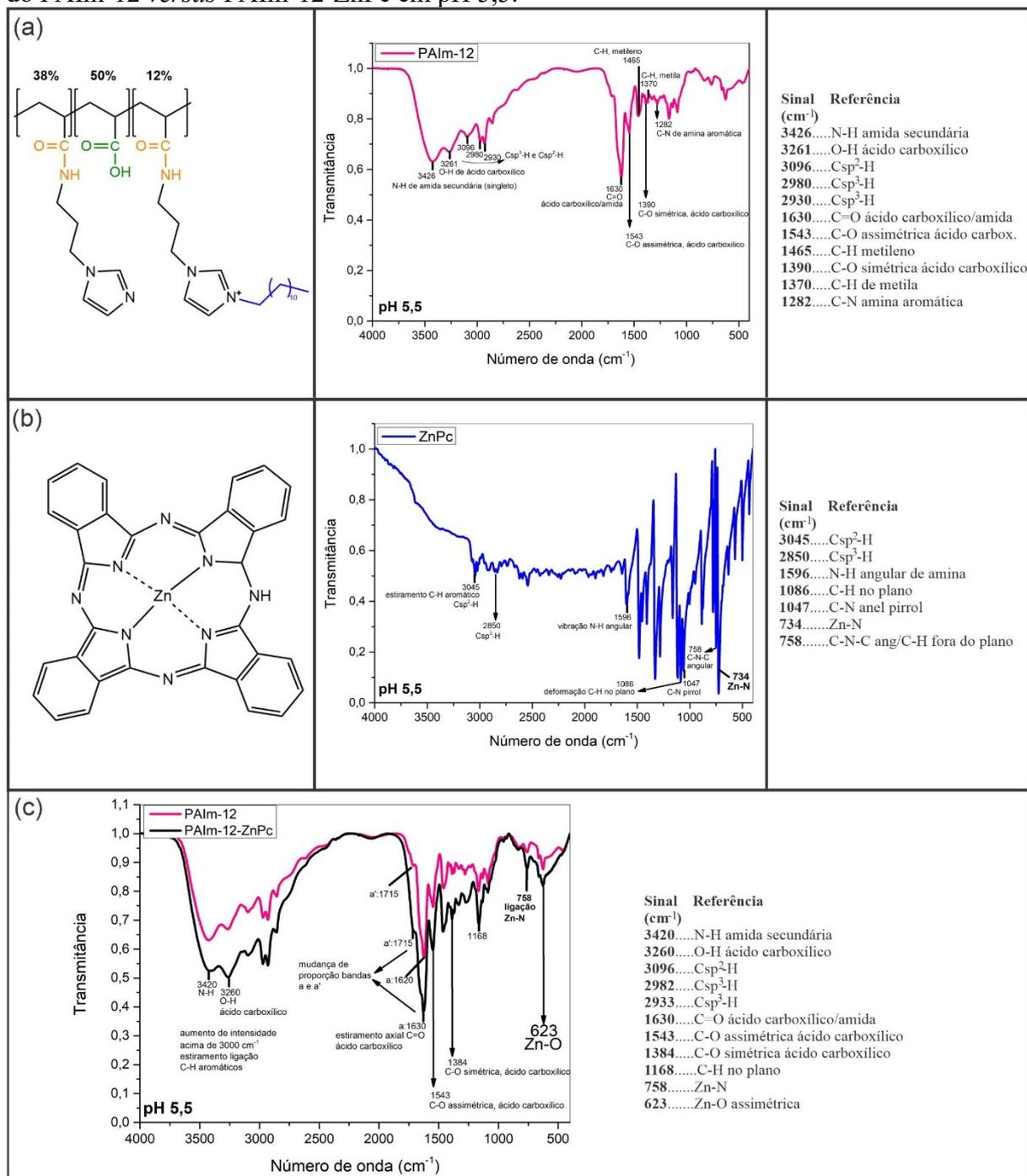
Para comprovar a interação entre os componentes e formação do conjugado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, seu espectro de infravermelho foi adquirido e comparado ao de seus constituintes, PAIm-12, ZnPc e BioTMC. Os espectros foram avaliados seguindo a ordem de síntese. Na Figura 58, podemos observar os espectros do PAIm-12 e da ZnPc, obtidos isoladamente. O espectro de infravermelho do PAIm-12 (já discutido na seção 3.7.4, condição distinta) mostra os sinais característicos esperados para os grupos funcionais presentes no polímero, listados assim como segue: 3426 cm^{-1} , vibração axial da ligação N-H (em formato de singlete) representando amidas secundárias; 3261 cm^{-1} , vibração axial da ligação O-H de ácido carboxílico; 3096 cm^{-1} , vibração axial da ligação =C-H (alcenos); 2980 e 2930 cm^{-1} , vibração axial da ligação -C-H (alcanos); 1630 cm^{-1} , a banda representa a junção entre as vibrações axiais da ligação C=O de ácido carboxílico e de amida; 1543 cm^{-1} , vibração axial assimétrica da ligação C-O de ácido carboxílico; 1465 cm^{-1} , vibração angular C-H de grupo metileno (alcanos); 1390 cm^{-1} , vibração axial simétrica C-O de ácido carboxílico; 1370 cm^{-1} , vibração angular C-H de grupo metil (alcanos); 1282 cm^{-1} , vibração da ligação C-N de aminas aromáticas.[199] O espectro da ZnPc (Figura 58b) também revelou sinais característicos esperados para a molécula, como as vibrações axiais de ligação C-H de aromático em 3045 cm^{-1} ($\text{Csp}^2\text{-H}$) e 2850 cm^{-1} ($\text{Csp}^3\text{-H}$); 1596 cm^{-1} , vibração angular de ligação N-H de amina; 1086 cm^{-1} , deformação da ligação C-H no plano; 1047 cm^{-1} , vibração axial ligação C-N do anel pirrol; 758 cm^{-1} , que representa tanto a deformação da ligação C-H fora do plano quanto a vibração angular da ligação C-N-C. Neste espectro, uma importante banda que representa a ligação entre o centro metálico e o nitrogênio do anel pirrol (vibração da ligação Zn-N) foi destacada, em 734 cm^{-1} . [200]

A Figura 58c mostra o espectro de infravermelho do PAIm-12 antes (linha rosa) e depois (linha preta) da conjugação com a ZnPc. Neste último, uma série de alterações que indicam o sucesso da conjugação entre PAIm-12 e ZnPc puderam ser observadas. É bem descrito na literatura que o Zinco é capaz de coordenar-se ao carboxilato, formando complexos de Zinco.[201] As principais alterações que indicam a formação do complexo são descritas a seguir. Primeiramente, observou-se uma significativa alteração de proporção das bandas que representam as vibrações axiais do grupo carboxilato (C=O), que se encontram em 1630 e 1715

cm^{-1} . No PAIm-12, a proporção entre elas é de 1,56, enquanto no PAIm-12-ZnPc a proporção se altera para 1,74. Esta mudança de intensidade das bandas pode ser decorrente da interação do grupo carboxilato do PAIm-12 com o centro metálico (Zinco) da ZnPc, que afeta diretamente as ordens de ligação. Além disso, os complexos de Zinco-carboxilato reportados na literatura apresentam uma banda de fraca intensidade na região de $620\text{-}580\text{ cm}^{-1}$, relacionada à vibração axial assimétrica da ligação formada entre Zn-O.[202] Essa banda foi reportada no espectro de PAIm-12-ZnPc, em 623 cm^{-1} (destacado na Figura 58c), comprovando a formação da ligação entre Zinco e carboxilato. Cabe também destacar que os modos vibracionais simétrico e assimétrico da ligação C-O se encontram em 1384 e 1543 cm^{-1} , respectivamente, o que resulta em uma variação de 159 cm^{-1} . De acordo com a literatura, variações desta magnitude indicam coordenação bidentada ao metal (referencia: íon acetato).[202]

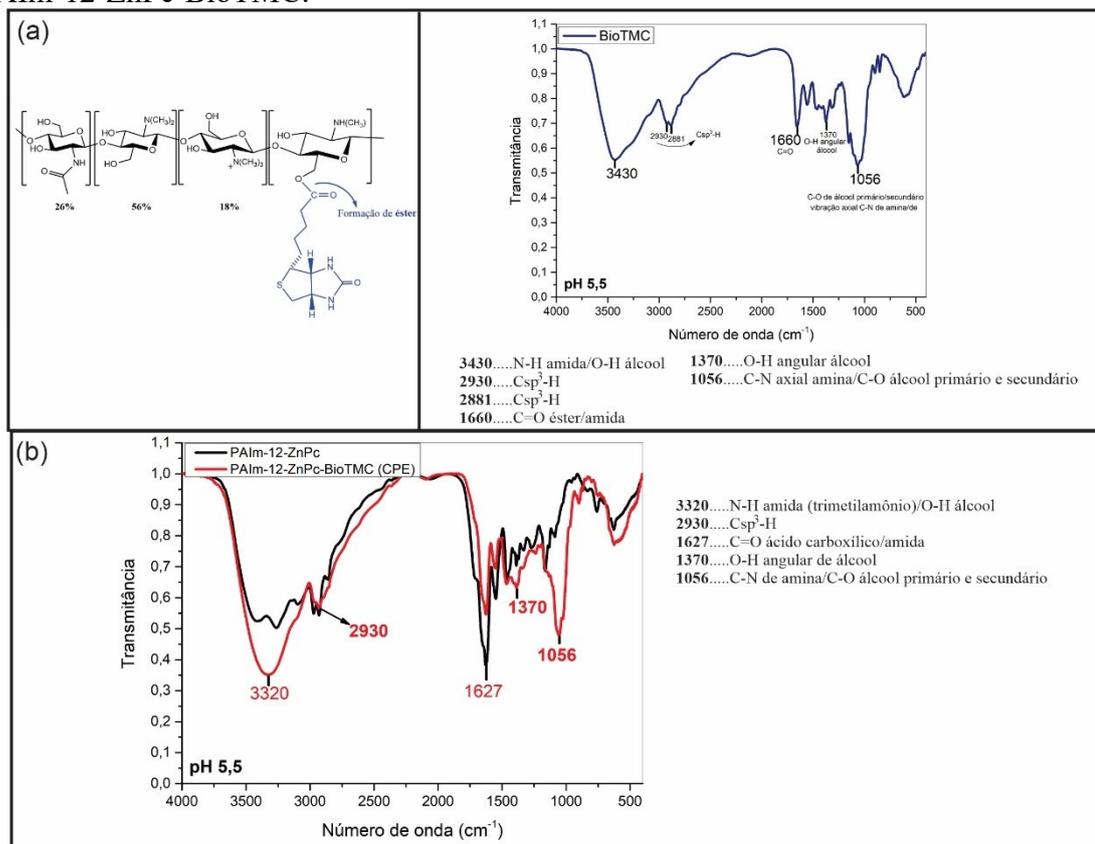
Outra alteração pertinente que aparece no espectro de PAIm-12-ZnPc se refere ao aumento de intensidade das bandas na região dos 3000 cm^{-1} . A ZnPc é uma molécula constituída por um grande sistema aromático que contém uma grande quantidade de ligações C-H, cujas vibrações axiais são responsáveis pelo aumento de intensidade na região mencionada. Nesta região, também ocorre uma mudança na proporção das bandas em 3420 cm^{-1} e 3260 cm^{-1} , esta última relacionada à ligação O-H de ácido carboxílico, que pode ser uma consequência da formação de ligação do carboxilato com o Zinco. Também é possível observar que o sinal que representa a ligação metal-nitrogênio (Zn-N) está presente e sofreu deslocamento (de 734 para 758 cm^{-1}), o que indica mudança de microambiente do centro metálico da ZnPc.

Figura 58 – Espectro de infravermelho (a) do PAIm-12 em pH 5,5, (b) da ZnPc em pH 5,5 e (c) do PAIm-12 versus PAIm-12-ZnPc em pH 5,5.



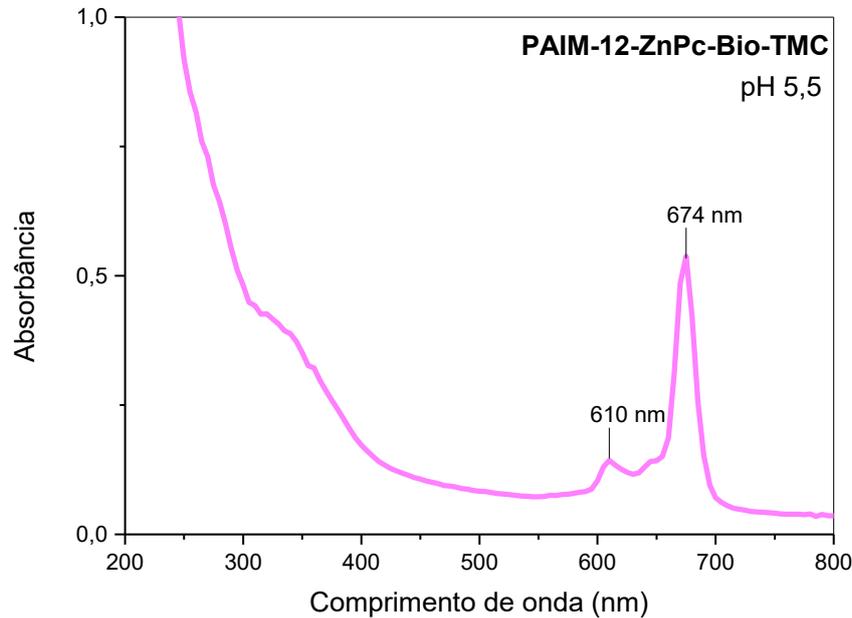
Com a obtenção do complexo intermediário PAIm-12-ZnPc, a etapa seguinte consistiu na adição de BioTMC para formação do CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC. Neste processo, esperava-se haver a interação entre os sítios aniônicos do PAIm-12 (grupos carboxilato) com os sítios catiônicos da BioTMC (grupos trimetilamônio). O espectro de infravermelho do conjugado apresenta indícios de interação do grupo carboxilato com o grupo trimetilamônio, que confirmaram a presença de BioTMC (Figuras 59a e b). Em primeiro lugar, é possível observar que a banda que representa a vibração de alongamento da ligação N-H dos grupos trimetilamônio sofre um deslocamento de 3430 cm^{-1} na Bio-TMC para 3320 cm^{-1} no PAIm-12-ZnPc-BioTMC. Este deslocamento, em geral, pode ser derivado de interações com o grupo carboxilato, principalmente nos casos em que a formação de ligação de hidrogênio entre os dois grupos funcionais é favorecida. Outro ponto a ser destacado é referente à banda que representa a deformação axial da ligação C=O (1627 cm^{-1}), que sofreu uma redução significativa de intensidade que pode ser associada à interação com os grupos trimetilamônio. A alteração que ocorre na região em torno de 2930 cm^{-1} pode ser relacionada à presença dos grupos trimetilamônio da BioTMC que contêm grupos metila, que possuem ligações C-H que exibirão vibrações axiais na região mencionada. Também é interessante destacar o aparecimento da banda em torno de 1370 cm^{-1} no espectro do CPE (Figura 59b), que corresponde às vibrações angulares da ligação O-H de álcoois, função orgânica que não estava presente no conjugado antes da introdução de BioTMC, o que comprova que a funcionalização com o polímero biotínido ocorreu com sucesso. O espectro do PAIm-12-ZnPc-BioTMC também apresenta uma banda intensa característica da BioTMC, em 1056 cm^{-1} , que diz respeito às vibrações axiais C-N de amina. A partir das análises dos infravermelhos, conclui-se que a formação do CPE com os polímeros PAIm-12 e BioTMC e o FS ZnPc foi bem sucedida.

Figura 59 – Espectros de infravermelho (a) da BioTMC e (b) comparação entre PAIm-12-ZnPc e PAIm-12-ZnPc-BioTMC.



O CPE obtido apresentou coloração azul clara em solução aquosa, forma na qual foi armazenado, mantido no escuro. Seu perfil de absorção de UV-Vis encontra-se na Figura 60. Como se pode observar, o CPE em solução aquosa (pH 5,5) apresentou duas bandas de absorção características do fotossensibilizador ZnPc, em 610 e 674 nm – bandas Q_I e Q_{III}, respectivamente. O perfil destas bandas assemelha-se àquele apresentado pela ZnPc em etanol (Figura 41a), diferindo daquele em água (Figura 41b), o que mostra que, no CPE sintetizado, as moléculas de ZnPc encontram-se monomerizadas, o que aponta para um encapsulamento bem sucedido. Além disso, as bandas sofreram deslocamento batocrômico, uma vez que a banda Q_I em etanol apresentava máximo em 605 nm e a banda Q_{III}, em 664 nm. Tal comportamento deriva da mudança de ambiente da ZnPc nos diferentes sistemas, e também de possíveis interações do centro metálico com os grupos funcionais dos polímeros com os quais a ZnPc interage no CPE, assim como mostraram as análises de infravermelho.

Figura 60 – Perfil de absorção de luz UV-Vis do conjugado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, em pH 5,5. $[ZnPc] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[PAIm-12] = 2,87 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[BioTMC] = 0,55 \text{ g L}^{-1}$.



A região de comprimento de onda abaixo de 400 nm representa a absorção de luz dos componentes das matrizes dos polímeros constituintes do CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC, como por exemplo do imidazol – na região abaixo de 300 nm[203], e também da quitosana, que apresenta uma transição $\pi-\pi^*$ na mesma região.[204]

A seguir, caracterizações de tamanho e potencial Zeta foram realizadas. O tamanho dos conjugados de PAIm-12-ZnPc-BioTMC foi investigado por espalhamento dinâmico de luz. As leituras foram realizadas em triplicata e, a partir delas, montou-se o histograma presente na Figura 61, que indica um maior número de partículas na faixa dos 100 nm. O potencial Zeta foi determinado através da mesma técnica, também em triplicata (exemplo de medida na Figura 62), resultando em uma carga superficial média de +29,2 mV.

Figura 61 – Histograma de distribuição de tamanhos para o conjugado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, obtido a partir da média aritmética de medidas realizadas em triplicata. $[\text{ZnPc}] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{PAIm-12}] = 2,87 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{BioTMC}] = 0,55 \text{ g L}^{-1}$.

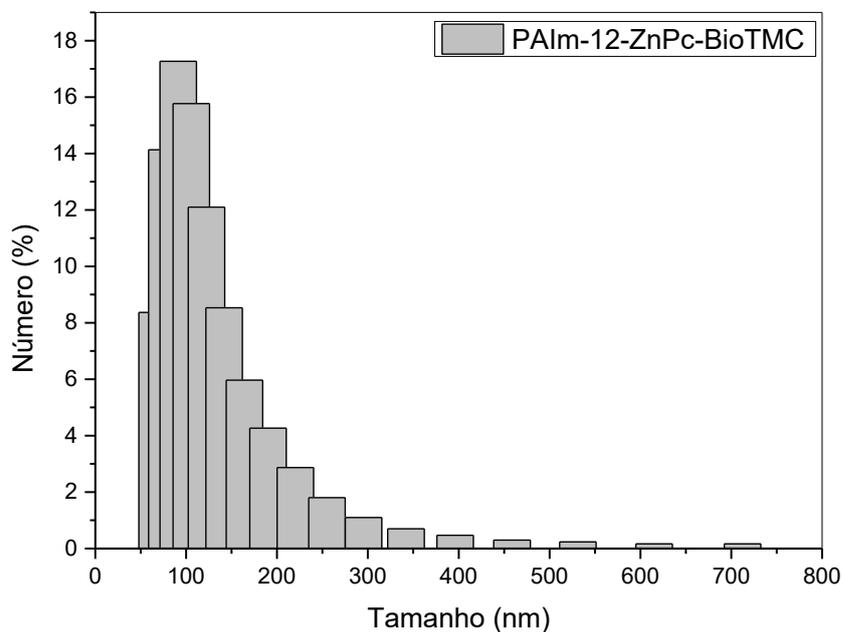
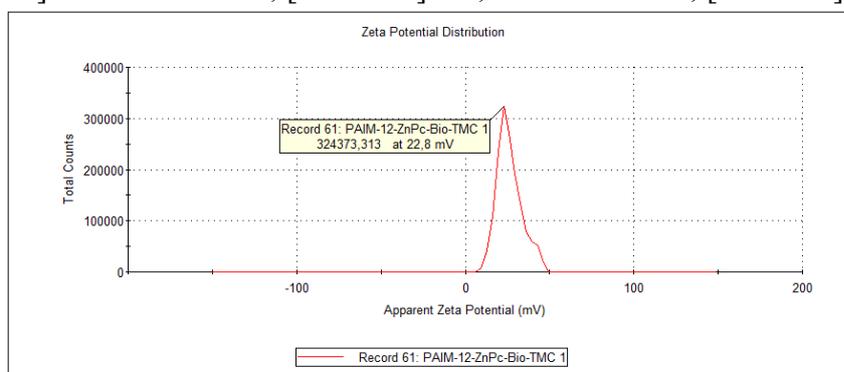


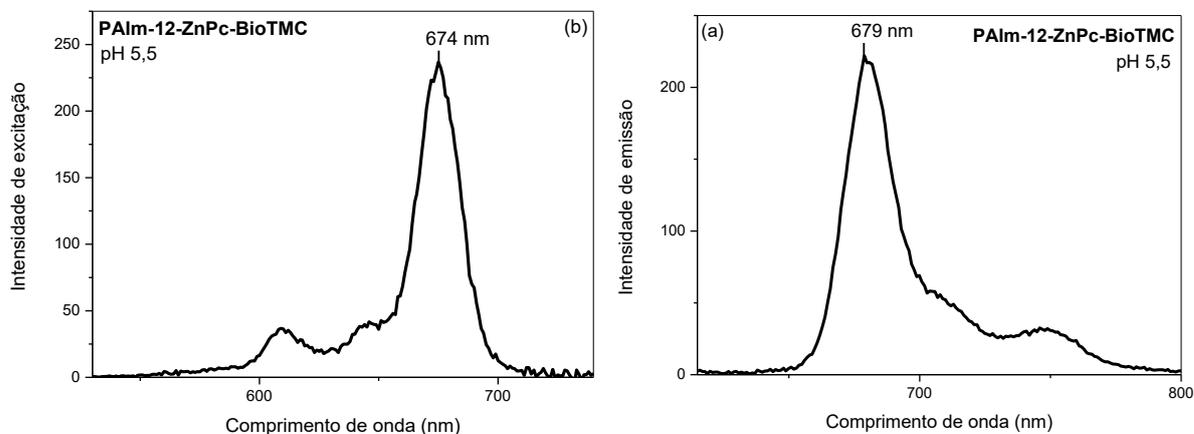
Figura 62 – Resultado para uma das medidas de potencial Zeta da amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC. $[\text{ZnPc}] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{PAIm-12}] = 2,87 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{BioTMC}] = 0,55 \text{ g L}^{-1}$.



Para fins de comparação, o intermediário PAIm-12-ZnPc também foi caracterizado quanto a tamanho e potencial Zeta. O tamanho médio obtido ficou em torno de 344 nm, com uma carga superficial positiva de +10,3 mV. O pequeno potencial Zeta encontrado para o complexo PAIm-ZnPc justifica a aplicação do polímero BioTMC para fins de estabilização do CPE, uma vez que o pequeno potencial Zeta pode favorecer processos de agregação de partículas, situação que se percebe ao analisarmos o maior tamanho encontrado para o intermediário.

Uma vez conjugada aos polímeros, as propriedades fotofísicas da ZnPc foram reavaliadas. Na Figura 63a, pode-se observar que o espectro de excitação da ZnPc apresenta perfil similar ao seu espectro de absorção em etanol, condição em que as moléculas se encontram em sua forma monomérica. A Figura 63b mostra que, após o encapsulamento ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC a ZnPc apresenta emissão de fluorescência, indicando a solubilização do FS na forma monomérica. O comprimento de onda máximo de emissão de fluorescência encontra-se em 679 nm, resultando em um $\Delta\nu$ de 109 cm^{-1} . Para a ZnPc livre em etanol, o $\Delta\nu$ é de 223 cm^{-1} . A diferença entre o comprimento de onda máximo de absorção e emissão se dá pela desativação do estado excitado através de conversão interna (CI). Ou seja, após o encapsulamento da ZnPc, os processos de desativação do estado excitado por CI são desfavorecidos, favorecendo a ocorrência de outros caminhos de desativação, conforme investigado abaixo.

Figura 63 – (a) Espectro de excitação do conjugado PAIm-12-ZnPc-BioTMC, em pH 5,5, fenda 5 nm. (b) Espectro de emissão de fluorescência do conjugado, em pH 5,5. λ de excitação em 605 nm, fenda em 5 nm. $[\text{ZnPc}] = 5 \times 10^{-6}\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{PAIm-12}] = 2,87 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$; $[\text{BioTMC}] = 0,55\text{ g L}^{-1}$.



O rendimento quântico de emissão de fluorescência e o tempo de meia vida da ZnPc no conjugado foi comparado ao da sua forma livre em etanol e em água. Os resultados estão registrados na Figura 64 e na Tabela 6. Foi possível observar uma redução de cerca de 64% no ϕ_F da ZnPc após encapsulamento no conjugado, quando comparado ao de sua forma livre em etanol (Tabela 6). Considerando que os processos de desativação do estado excitado são competitivos, e o somatório dos percentuais de contribuição deve ser igual a 1, a redução das

transições $S_1 \rightarrow S_0$ por emissão de fluorescência pode favorecer o acontecimento de outros processos após a excitação da ZnPc, como, por exemplo, o cruzamento intersistema (CIS). O CIS é uma transição do tipo $S_1 \rightarrow T_1$, onde a ZnPc passa do estado excitado singleto para o estado tripleto, havendo compatibilidade de spin com o oxigênio molecular (3O_2 , que, no estado fundamental, encontra-se também no estado tripleto). No momento em que o 3FS possui compatibilidade de spin com o 3O_2 , as reações de transferência de energia daquele para este são permitidas por spin, possibilitando a formação de oxigênio singleto (1O_2), bem como as reações que envolvem transferência de elétrons e levam a formação de espécies radicalares de oxigênio, as chamadas EROs.[205] Ou seja, a redução no ϕ_F da ZnPc após encapsulamento no conjugado pode favorecer o processo de CIS, levando a um aumento da quantidade de 1O_2 e EROs formados, espécies altamente oxidantes que são responsáveis por produzirem o efeito citotóxico terapêutico em TFD.

Figura 64 – Espectros obtidos para os cálculos de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_F). (a) Espectros de absorção UV-Vis da ZnPc livre em etanol (linha preta), ZnPc livre em água (linha vermelha) e ZnPc conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC (linha azul). As leituras de absorbância para o cálculo de ϕ_F foram realizadas em 605 nm, correspondente ao comprimento de onda empregado na excitação. (b) Perfil de emissão da ZnPc em etanol. (c) Perfil de emissão da ZnPc em água. (d) Perfil de emissão da ZnPc no conjugado. $[ZnPc] = 5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

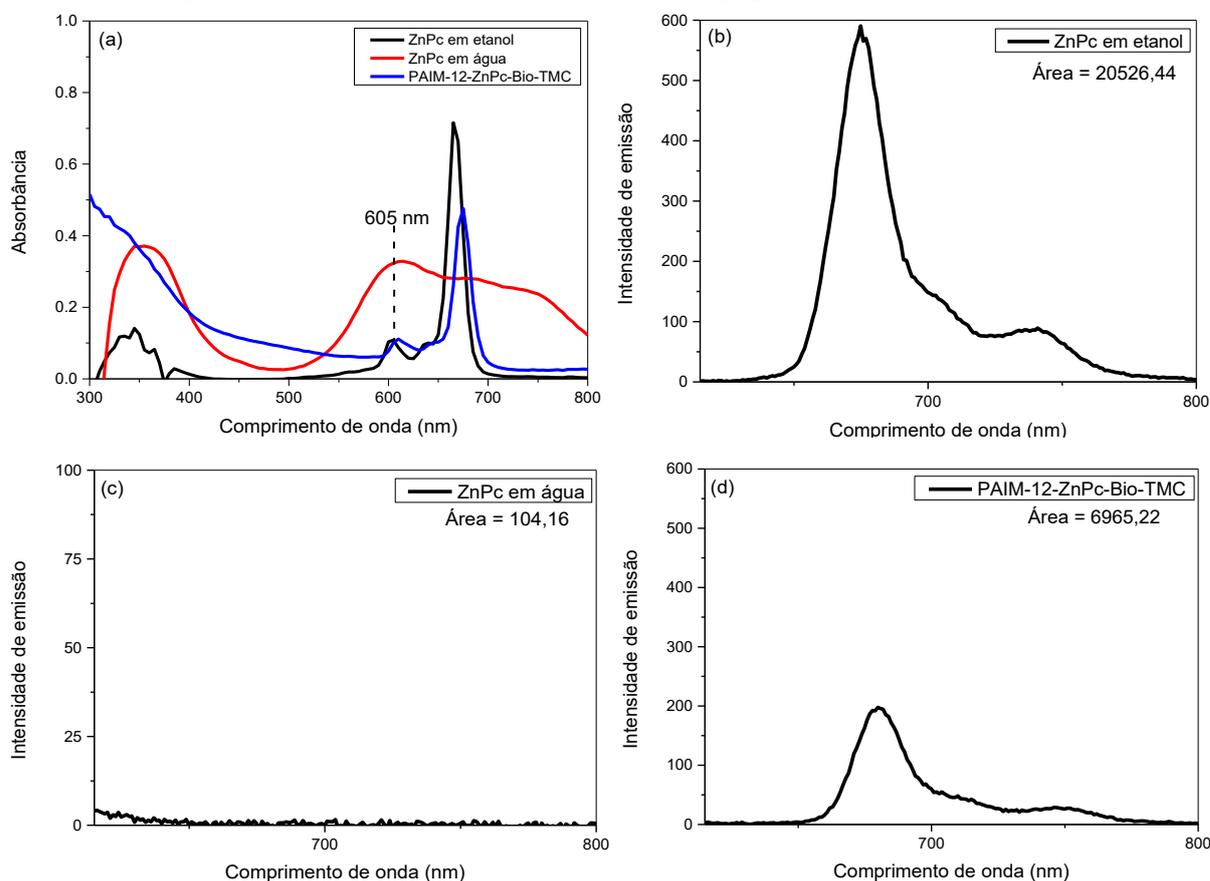


Tabela 6 - ϕ_F e τ determinados experimentalmente para a ZnPc em diferentes microambientes.

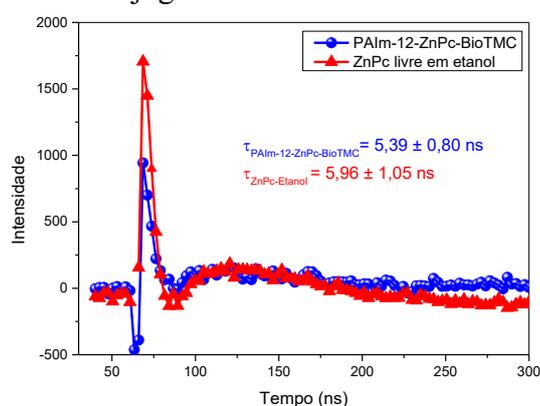
Amostra	Absorbância (A, em 605 nm)	Área (F)	ϕ_F	τ (ns)
ZnPc em etanol	0,108	20526,44	0,53*	5,96±1,05
ZnPc em água	0,325	104,16	$9,30 \times 10^{-4}$	-
PAIm-12-ZnPc-BioTMC	0,102	6965,22	0,19	5,39±0,80

* A amostra ZnPc em etanol foi utilizada como padrão de comparação (ϕ_R), tendo sido o valor de ϕ_F retirado da literatura.[182]

Os tempos de meia vida de emissão de fluorescência (τ) foram medidos (Figura 65) e os valores determinados em etanol ($5,96 \pm 1,05$ ns) estão de acordo com os valores encontrados na literatura[206]. Em água, não foi possível determinar o τ , uma vez que o processo de emissão é suprimido neste solvente devido ao processo de autoagregação[207]. Os valores de τ da ZnPc

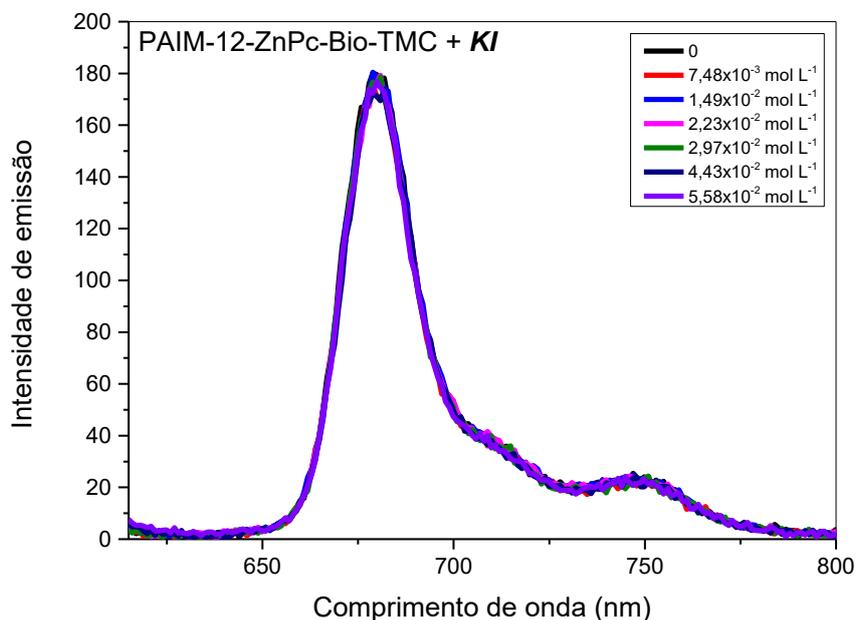
em etanol e no CPE ($5,39 \pm 0,80$ ns) foram similares entre si, indicando que a espécie que emite fluorescência é a mesma em ambos os casos, e que no CPE a fração dessa espécie diminui levando a diminuição do ϕ_F . Uma vez que nos espectros de absorção da ZnPc não se observou bandas características de agregados, atribui-se a diminuição observada ao favorecimento de outros caminhos de desativação do estado excitado.

Figura 65 – Cinéticas de decaimento de fluorescência resolvida no tempo, em nanosegundos, empregando LED de 370 nm, filtro 380 nm, para determinação do τ da ZnPc livre em etanol e ZnPc conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC.



Os espectros de emissão também confirmam o encapsulamento da ZnPc no conjugado, uma vez que o CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC foi sintetizado e armazenado em solução aquosa, e, como podemos ver, a ZnPc livre em água não apresenta emissão de fluorescência (devido ao processo de autosupressão por formação de agregados). Se as moléculas de ZnPc da amostra PAIm-12-ZnPc-BioTMC estivessem em contato com a água, sem o revestimento polimérico do CPE, a amostra não apresentaria emissão de fluorescência. A junção dos espectros de absorção e emissão do conjugado confirmam que a ZnPc se encontra na forma monoméricas neste sistema. Ainda assim, para verificar a existência de distintas populações de ZnPc no conjugado, iodeto de potássio (KI) foi empregado como agente supressor de fluorescência.[208] Neste caso, o íon iodeto (I^-) é capaz de suprimir a fluorescência das moléculas de ZnPc que possivelmente estejam presentes no lado externo dos agregados de PAIm-12 e Bio-TMC, não sendo capaz de afetar aquelas que se encontram encapsuladas em seu interior. A Figura 66 mostra que a intensidade de emissão da amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC não é afetada pela adição de diferentes concentrações de I^- , confirmando a existência de ZnPc encapsulada no CPE.

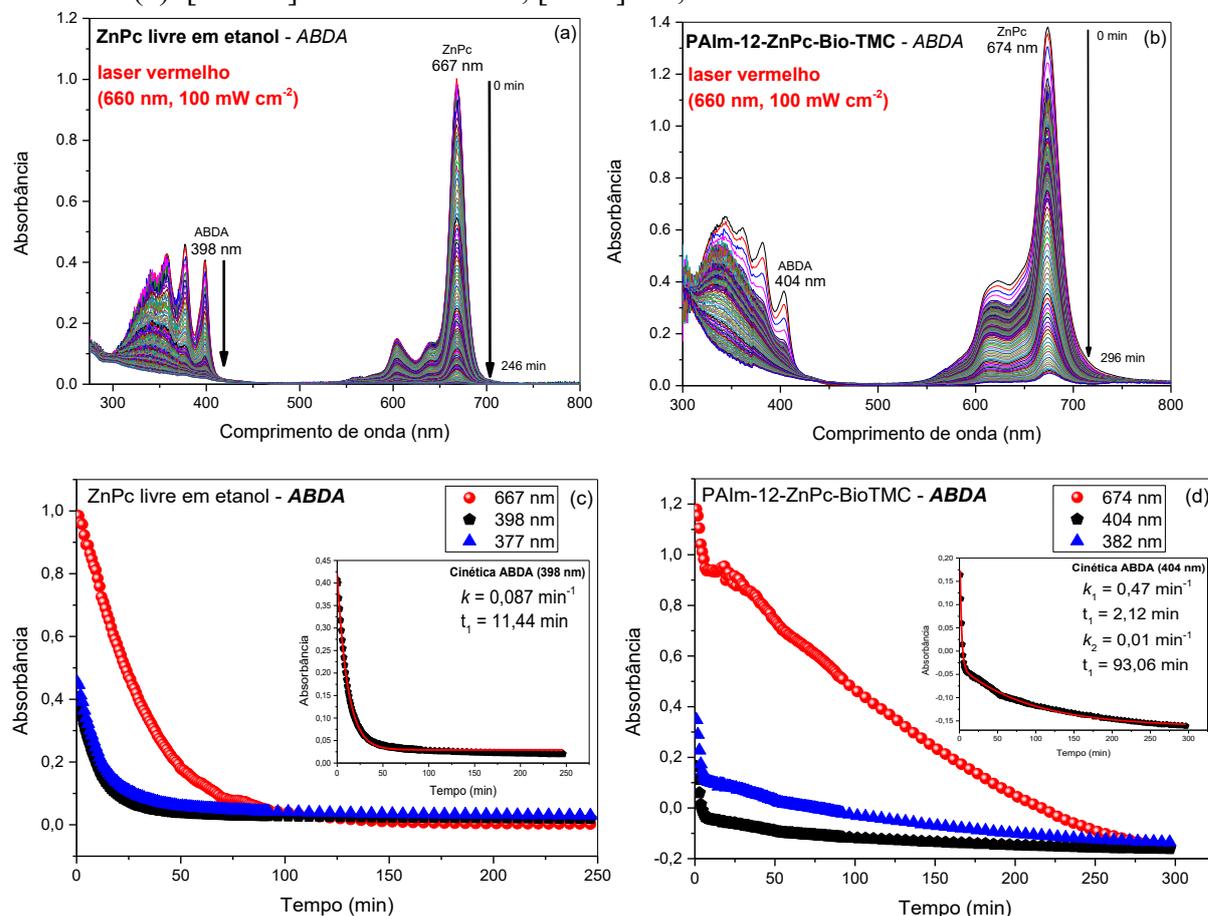
Figura 66 – Perfis de emissão de fluorescência da ZnPc conjugada ao CPE PAIm-12-ZnPc-BioTMC, com adições de alíquotas de uma solução aquosa de KI 3 mol L⁻¹.



3.7.7 Investigação da geração de EROS e ¹O₂ por ZnPc livre e PAIm-12-ZnPc-BioTMC

Uma vez conjugada ao CPE, tornou-se necessário averiguar se a ZnPc seria capaz de produzir EROS neste ambiente. Quando presentes em ambientes distintos, as propriedades fotoquímicas dos FS podem sofrer alterações, vindo a perder sua capacidade de geração de EROS, por exemplo, consequentemente tornando-se inativos em aplicações fotodinâmicas, como a TFD. Desta maneira, a capacidade de geração de EROS pela ZnPc conjugada ao CPE, perante absorção de luz (laser vermelho, 660 nm, 100 mW cm⁻²), foi comparada a da ZnPc livre em etanol, empregando a sonda ABDA, que é consumida na medida em que as espécies citadas são formadas. É possível observar, a partir dos espectros de absorção UV-Vis presentes nas Figuras 67 a e b, que a ZnPc tanto em sua forma livre em etanol quanto conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC é capaz de produzir EROS, uma vez que se percebe a degradação da sonda ABDA (em 398 ou 404 nm, respectivamente) a medida em que as amostras absorvem a luz vermelha do laser. Durante o experimento, sob absorção contínua da luz, a ZnPc sofreu foto-oxidação, uma vez que as EROS produzidas por ela reagem não somente com a sonda ABDA, mas também com o próprio FS, causando sua degradação.

Figura 67 – Perfis UV-Vis de foto-oxidação de ABDA na presença de ZnPc livre em etanol (a) e de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (b), empregando laser vermelho (660 nm, 100 mW cm⁻²). Cinéticas de foto-oxidação de ABDA e ZnPc para ZnPc livre em etanol (c) e PAIm-12-ZnPc-BioTMC (d). [ABDA] = 1×10⁻⁵ mol L⁻¹; [ZnPc] = 4,5×10⁻⁶ mol L⁻¹.



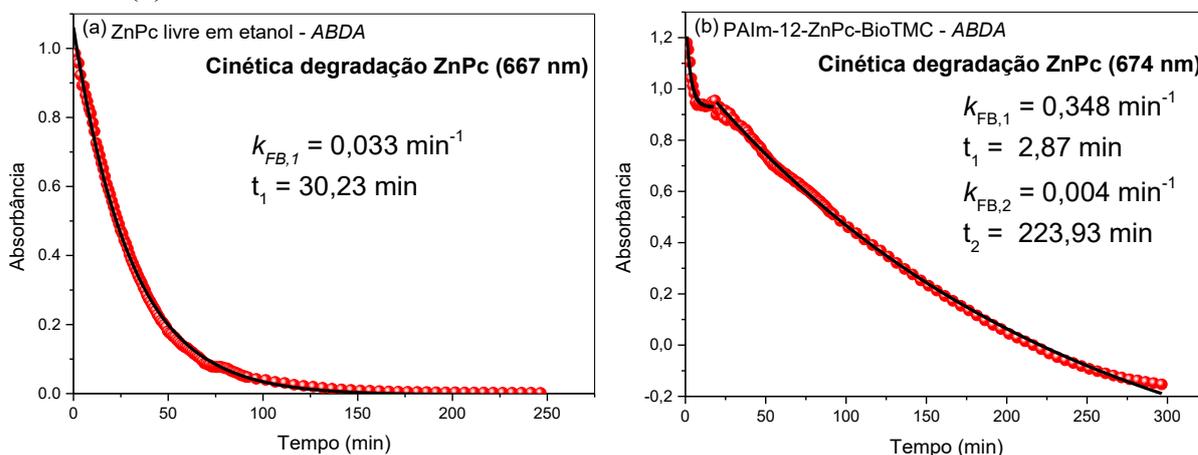
As cinéticas de degradação da ABDA foram acompanhadas em 398 e 377 nm para a ZnPc livre em etanol e em 404 e 382 nm para a ZnPc conjugada ao CPE. Como se pode perceber, a presença dos polímeros recobrando a molécula de ZnPc alterou o perfil de foto-oxidação tanto da sonda quanto do FS, saindo de um processo de primeira ordem de uma única etapa na amostra com ZnPc livre (Figura 67 c), para um processo de duas etapas consecutivas de primeira ordem para a amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (Figura 67 d).

A constante de velocidade de degradação da sonda ABDA na presença de ZnPc livre em etanol foi $k_1 = 0,087 \text{ min}^{-1}$ ($t_1 = 11,44 \text{ min}$) (Figura 67c), enquanto no CPE dois estágios foram analisados (Figura 67d), sendo que na primeira etapa, referente a degradação de 56% do ABDA, k_1 foi $0,47 \text{ min}^{-1}$ (5,4 vezes mais rápido do que em etanol) e na segunda etapa, referente a degradação de 44% do ABDA, k_2 foi de $0,011 \text{ min}^{-1}$ (7,9 vezes mais lento do que em etanol).

A existência de duas etapas distintas na presença do CPE, podem indicar a formação de diferentes espécies reativas de oxigênio e diferentes acessibilidades da sonda a essas espécies.

Conforme anteriormente mencionado, a ZnPc sofreu foto-oxidação durante o experimento em etanol e no CPE (Figuras 68 a e b). Novamente, o que foi observado foi um processo de decaimento de absorbância de primeira ordem com dois estágios consecutivos para a amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC, com um estágio inicial acelerado ($k_{FB,1} = 0,348 \text{ min}^{-1}$, $t_1 = 2,87 \text{ min}$) com degradação de cerca de 30% da ZnPC, seguido de um estágio final lento ($k_{FB,2} = 0,004 \text{ min}^{-1}$, $t_1 = 223,93 \text{ min}$) e degradação de 70% da ZnPc – Figura 68b. Ao comparar as k_{FB} em etanol ($k_{FB} = 0,033 \text{ min}^{-1}$, $t_1 = 30,23 \text{ min}$) e no CPE, tem-se um aumento de 10,6 vezes na 1ª etapa no CPE em relação ao etanol, e na segunda etapa uma diminuição de 7,3 vezes no CPE em relação a ZnPc livre. Em comparação com a ZnPc livre houve um efeito total de proteção da ZnPc no CPE, visto que a velocidade de degradação de 70% do FS diminuiu significativamente. Para maior compreensão das espécies envolvidas nos processos foto-oxidativos, avaliou-se as cinéticas de fotodegradação na presença de moléculas supressoras de espécies reativas de oxigênio.

Figura 68 – Cinéticas de foto-oxidação da ZnPc, obtidas no experimento de geração de EROs empregando a sonda ABDA, para a amostra de ZnPc livre em etanol (a) e PAIm-12-ZnPc-BioTMC (b).



O comportamento de foto-oxidação da sonda ABDA em ambos os sistemas também foi investigado na presença dos seguintes agentes supressores: azida de sódio (supressor de $^1\text{O}_2$); e dimetilsulfóxido (DMSO, supressor de radical hidroxila $\bullet\text{OH}$) (Figura 69), e os resultados estão sumarizados na Tabela 7.

Figura 69 - Perfil UV-Vis de foto-oxidação de ABDA (398 nm) na presença de ZnPc livre em etanol (a) e de PAIm-12-ZnPc-BioTMC (b), empregando azida de sódio como agente supressor de $^1\text{O}_2$, com fonte de iluminação de laser vermelho (660 nm, 100 mW cm^{-2}); (c) Cinética ABDA (398 nm) para ZnPc livre; (d) Cinética ABDA (404 nm) para ZnPc conjugada ao CPE; (e) Cinética de fotobranqueamento em 667 nm para ZnPc livre; (f) Cinética de fotobranqueamento em 674 nm para ZnPc conjugada. $[\text{ABDA}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{azida}] = 5 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$; $[\text{ZnPc}] = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.

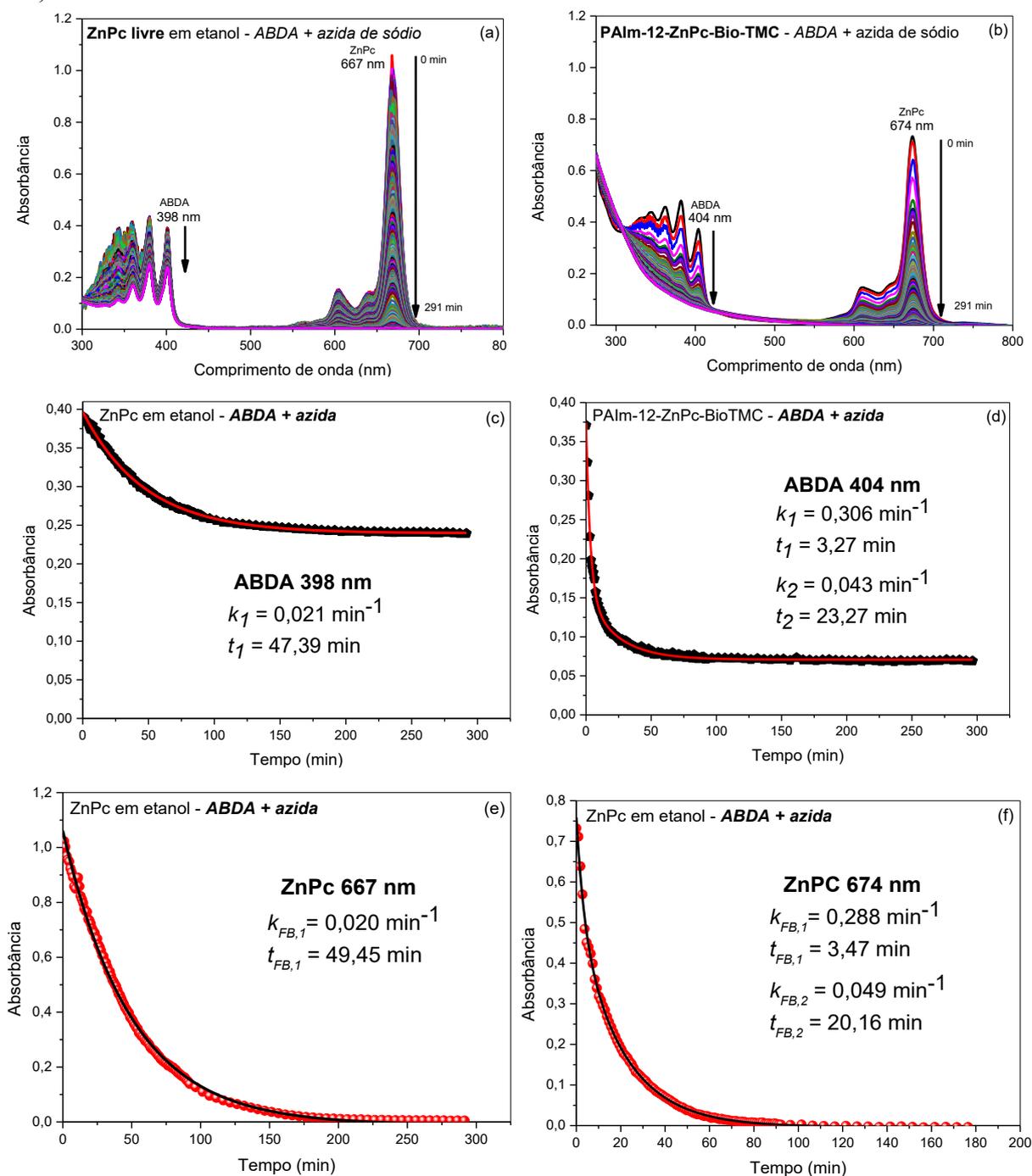


Tabela 7 – Constantes de velocidade (k) para a degradação da ABDA (k_1 e k_2) e constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}), para ZnPc livre em etanol e para PAIm-12-ZnPc-BioTMC em água, a 25 °C. As medidas foram realizadas na ausência e na presença de supressores.

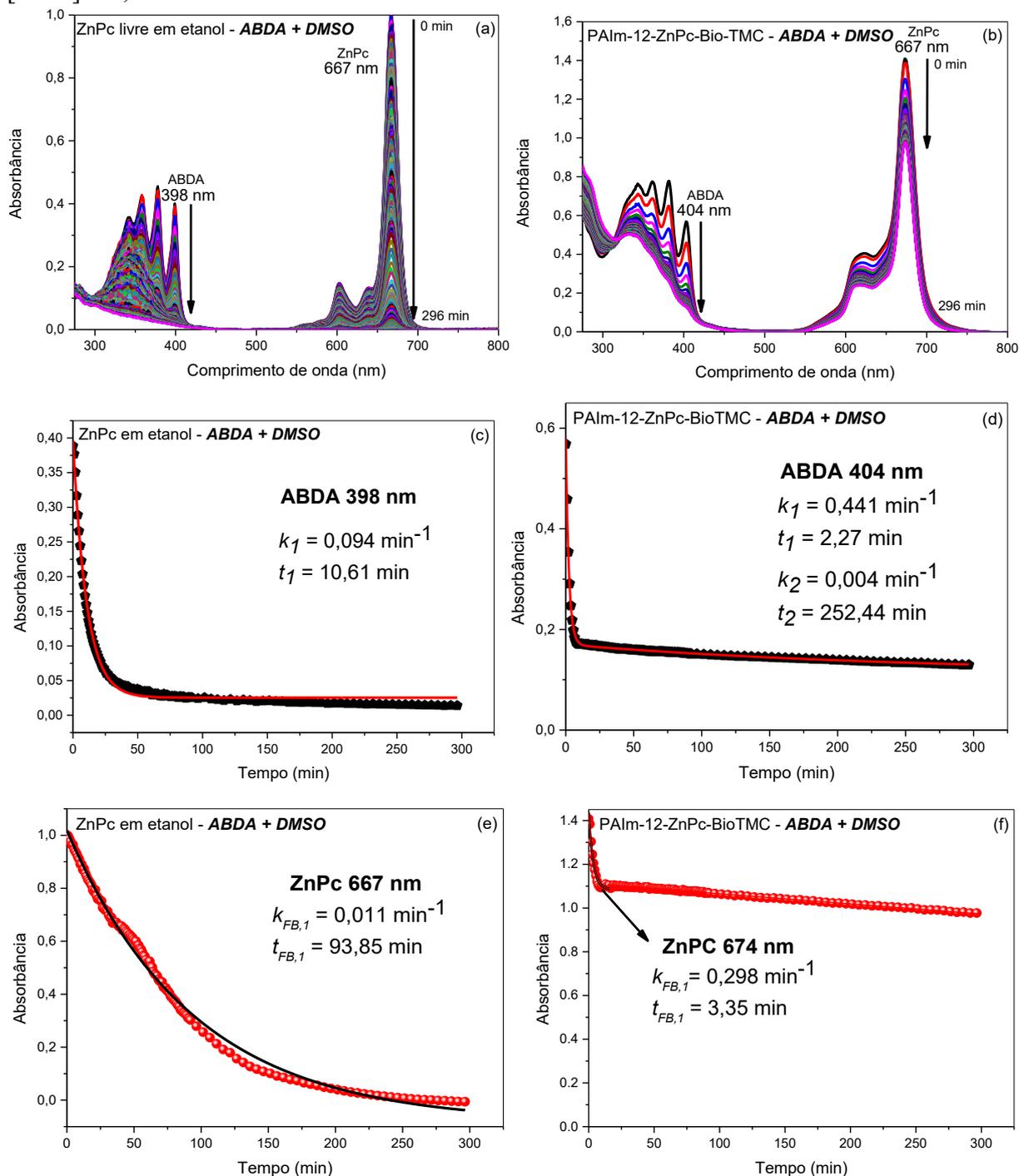
Supressor	k (10^{-2} min^{-1})	ZnPc livre	PAIm-12-ZnPc-BioTMC
- ^a	k_1	8,70±0,10	47,05±1,29
	k_2	-	1,07±0,03
	$k_{FB,1}$	3,30±0,03	34,84±3,87
	$k_{FB,2}$	-	0,45±0,01
Azida ^b	k_1	2,10±0,02	30,57±0,87
	k_2	-	4,30±0,17
	$k_{FB,1}$	2,02±0,02	28,82±2,21
	$k_{FB,2}$	-	4,96±0,11
DMSO ^c	k_1	9,42±0,14	44,08±0,45
	k_2	-	0,40±0,06
	k_{FB}	1,07±0,02	29,82±2,65

^a sem supressor, ^b na presença de azida de sódio (2 mol L⁻¹), ^c na presença de DMSO 10%.

Em etanol e na presença de azida de sódio (Figura 69a e 69c), observou-se uma diminuição de 4,1 vezes na velocidade de degradação do ABDA em relação ao experimento realizado na ausência do supressor. Destaca-se que, na amostra de ZnPc livre, há uma redução de 4 vezes da constante de velocidade na ausência de ¹O₂, saindo de 8,70×10⁻² min⁻¹ para 2,10×10⁻² min⁻¹. Em adição, observou-se uma porcentagem de ABDA degradado de 38% (Figura 69c) na presença de azida de sódio e 98 % na ausência do supressor. Na presença de DMSO, supressor de •OH, não houve alterações significativas na velocidade de fotodegradação (vide Tabela 7). Estes resultados evidenciam a importância do ¹O₂ na fotodegradação do ABDA em etanol. Quando se analisa o efeito das espécies supressoras na decomposição do ABDA no CPE, observa-se para k_1 uma diminuição de 1,6 vezes na presença de azida (de 47,05×10⁻² min⁻¹ para 30,57×10⁻² min⁻¹ - Tabela 7), não havendo redução significativa na presença de DMSO. É importante mencionar que a diminuição de k_1 de 1,6 vezes é significativamente menor do que a observada em etanol, cuja diminuição foi de 4,1 vezes, evidenciando que no CPE a participação do ¹O₂ como espécie oxidante para o ABDA é menos importante. Além disso, a

degradação de ABDA em etanol na presença de azida mostrou uma degradação de 38% da molécula, enquanto na amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC observou-se quase completa degradação da ABDA após 75 min de iluminação. Para a segunda etapa da reação, observa-se uma diminuição de k_2 de 2,6 vezes na presença de DMSO, indicando que no CPE a participação de radicais hidroxia é mais relevante do que em etanol, onde não se observou variações consideráveis. Estes resultados sugerem a mudança no mecanismo de fotodegradação do ABDA no CPE em relação ao etanol onde o oxigênio singlete é a principal espécie oxidante, sendo que no CPE o papel do radical $\bullet\text{OH}$ é fundamental.

Figura 70 – Espectros de absorção UV-Vis de foto-oxidação de ABDA (398 nm) na presença de ZnPc livre em etanol (a) e de PAlm-12-ZnPc-BioTMC (b), empregando DMSO como agente supressor de $\bullet\text{OH}$, com fonte de iluminação de laser vermelho (660 nm, 100 mW cm^{-2}); (c) Cinética ABDA (398 nm) para ZnPc livre; (d) Cinética ABDA (404 nm) para ZnPc conjugada ao CPE; (e) Cinética de fotobranqueamento em 667 nm para ZnPc livre; (f) Cinética de fotobranqueamento em 674 nm para ZnPc conjugada. $[\text{ABDA}] = 1 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$; 10% DMSO; $[\text{ZnPc}] = 4,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$.



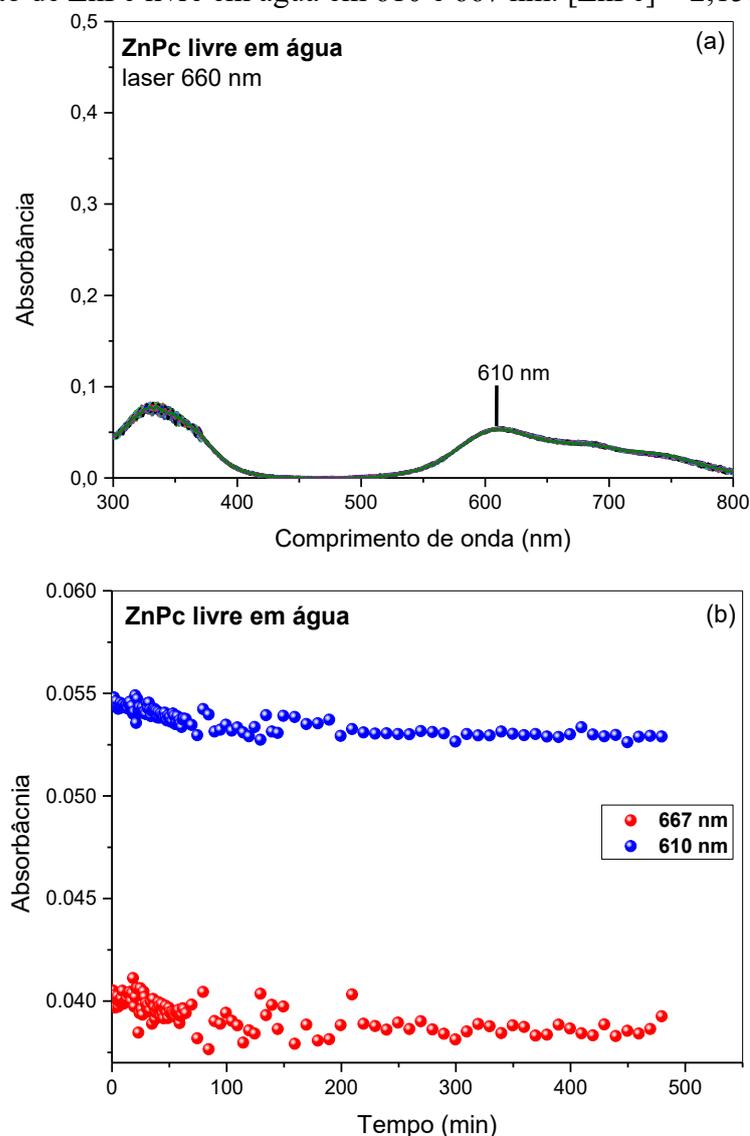
O efeito dos agentes supressores ainda pode ser avaliado com relação ao fotobranqueamento da ZnPc em ambas as formas livre e conjugada, em 667 e 674 nm, respectivamente. Ao observarmos as k_{FB} para ZnPc livre, presentes na Tabela 7, podemos perceber que há uma redução mais significativa de k_{FB} na presença de DMSO (de $3,30 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para $1,07 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ – redução de 3 vezes) do que na presença de azida (de $3,30 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ para $2,02 \times 10^{-2} \text{ min}^{-1}$ – redução de 1,6 vezes), indicando que a principal espécie responsável pelo fotobranqueamento da ZnPc livre é o radical $\bullet\text{OH}$, havendo contribuição em menor proporção do $^1\text{O}_2$. Para o caso da ZnPc conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC, não foi possível determinar a k_{FB} do segundo estágio de degradação com DMSO, portanto a discussão foi realizada de forma qualitativa a partir dos perfis cinéticos presentes nas Figuras 69f e 70f. Na presença de azida, a ZnPc foi completamente fotobranqueada durante os 291 min de iluminação, ao passo em que, neste mesmo intervalo de tempo, na presença de DMSO, a ZnPc sofreu redução de apenas 24% de sua absorbância (de 1,43 para 1,08). Esta degradação ocorreu de forma muito acelerada - nos primeiros 11 min de iluminação – permanecendo constante a concentração de ZnPc até o fim do experimento. Os experimentos indicam que, uma vez conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC, o radical $\bullet\text{OH}$ é a principal espécie responsável pelo fotobranqueamento da ZnPc.

3.7.8 Fotoestabilidade

A resistência ao fotobranqueamento da ZnPc na sua forma livre, em água e em etanol, e na forma conjugada (PAIm-12-ZnPc-BioTMC) foi investigada, empregando como fonte de iluminação um laser vermelho (660 nm, 100 mW cm^{-2}), cujo comprimento de onda de emissão é correspondente com a faixa de absorção de luz visível da ZnPc.

Conforme esperado, em água a ZnPc apresenta alta resistência ao fotobranqueamento (Figura 71), uma vez que suas moléculas se apresentam na forma agregada (Figura 71a), condição que favorece a desativação do estado excitado S_1 por conversão interna.[209] As cinéticas foram acompanhadas em 610 nm (comprimento de onda de absorção máximo do agregado) e em 667 (comprimento de onda empregado ao decorrer desta seção para ZnPc livre), entretanto, em nenhum dos casos observou-se fotobranqueamento (Figura 71b).

Figura 71 – (a) Perfil de absorção UV-Vis representativo dos 480 min de iluminação da amostra de ZnPc livre em água, empregando laser vermelho (660nm, 100 mW cm⁻²); (b) Cinética de fotobranqueamento de ZnPc livre em água em 610 e 667 nm. [ZnPc] = 2,15×10⁻⁷ mol L⁻¹.



Em seguida, a fotoestabilidade da ZnPc em etanol (Figura 72) e conjugada ao CPE (Figura 73) foi investigada, bem como seus respectivos rendimentos quânticos de fotobranqueamento (ϕ_{FB} – Tabela 8). Mais uma vez, as cinéticas de foto-oxidação da ZnPc mostraram perfil de primeira ordem, de uma única etapa para ZnPc livre em etanol (Figura 72b) e de duas etapas consecutivas para a ZnPc conjugada no CPE (Figura 73b). Em sua forma livre em etanol, a ZnPc apresentou maior resistência à foto-oxidação, apresentando menor constante de velocidade de fotobranqueamento ($k_{FB} = 0,011 \text{ min}^{-1}$) quando comparada à sua forma conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC ($k_{FB,1} = 0,47 \text{ min}^{-1}$; $k_{FB,2} = 0,024 \text{ min}^{-1}$). Em todas as

cinéticas fotoinduzidas apresentadas nesta Tese, a amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC apresentou o mesmo comportamento de foto-oxidação para a ZnPc, com um primeiro estágio de decaimento acelerado, seguido de um segundo estágio mais lento.

O rendimento quântico de fotobranqueamento (foto-oxidação), ϕ_{FB} , é uma medida da estabilidade da molécula submetida à foto-oxidação. Ainda que a ZnPc na amostra de PAIm-12-ZnPc-BioTMC tenha apresentado menor fotoestabilidade, a mesma apresentou menor ϕ_{FB} (0,071 na 1ª etapa e 0,0026 na 2ª etapa) quando comparado a sua forma livre em etanol ($\phi_{FB} = 0,12$) – Tabela 8. Isso significa que, após a conjugação aos polímeros, uma parcela inferior dos fótons absorvidos é empregada em sua auto-oxidação, se comparamos o mesmo processo na ZnPc livre. É importante lembrar que a baixa fotoestabilidade é uma desvantagem quando se planejam CPEs carregados com FS para futuras aplicações biológicas.[210]

Figura 72 - (a) Espectros de absorção UV-Vis representativo dos 480 min de iluminação da amostra de ZnPc livre em etanol, empregando laser vermelho (660nm, 100 mW cm⁻²); (b) Cinética de fotobranqueamento de ZnPc livre em etanol em 667 nm. [ZnPc] = 2,15×10⁻⁷ mol L⁻¹.

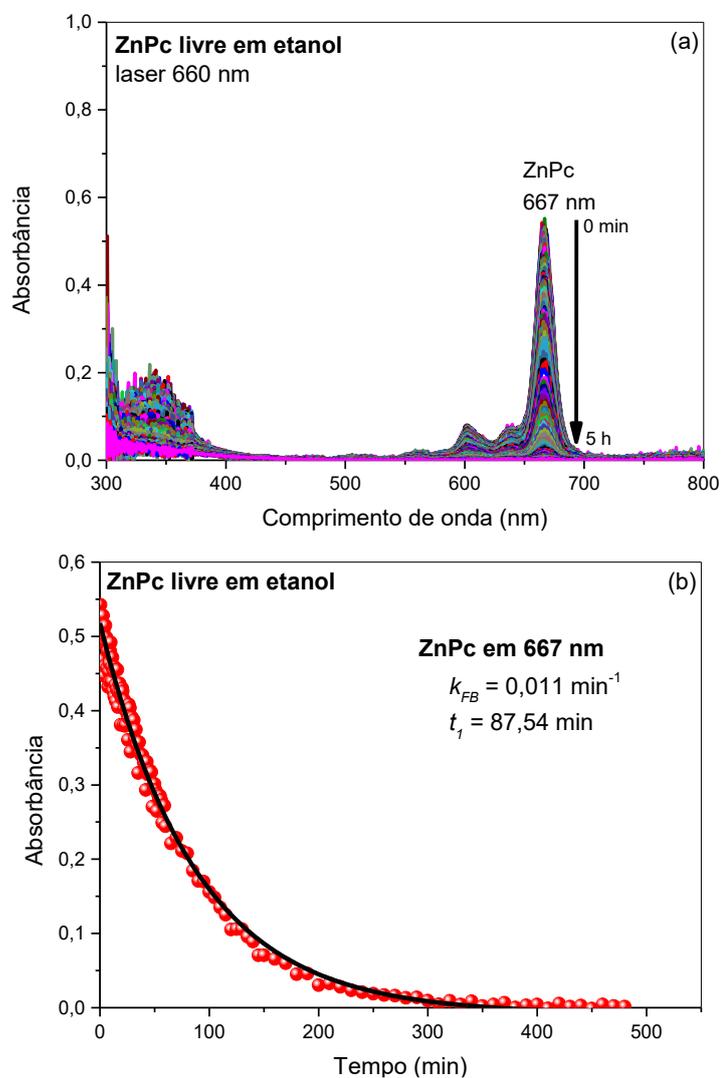


Figura 73 - (a) Perfil de absorção UV-Vis representativo dos 60 min de iluminação da amostra de ZnPc conjugada ao PAIm-12-ZnPc-BioTMC, empregando laser vermelho (660nm, 100 mW cm^{-2}); (b) Cinética de fotobranqueamento de ZnPc em 674 nm. $[\text{ZnPc}] = 2,15 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$.

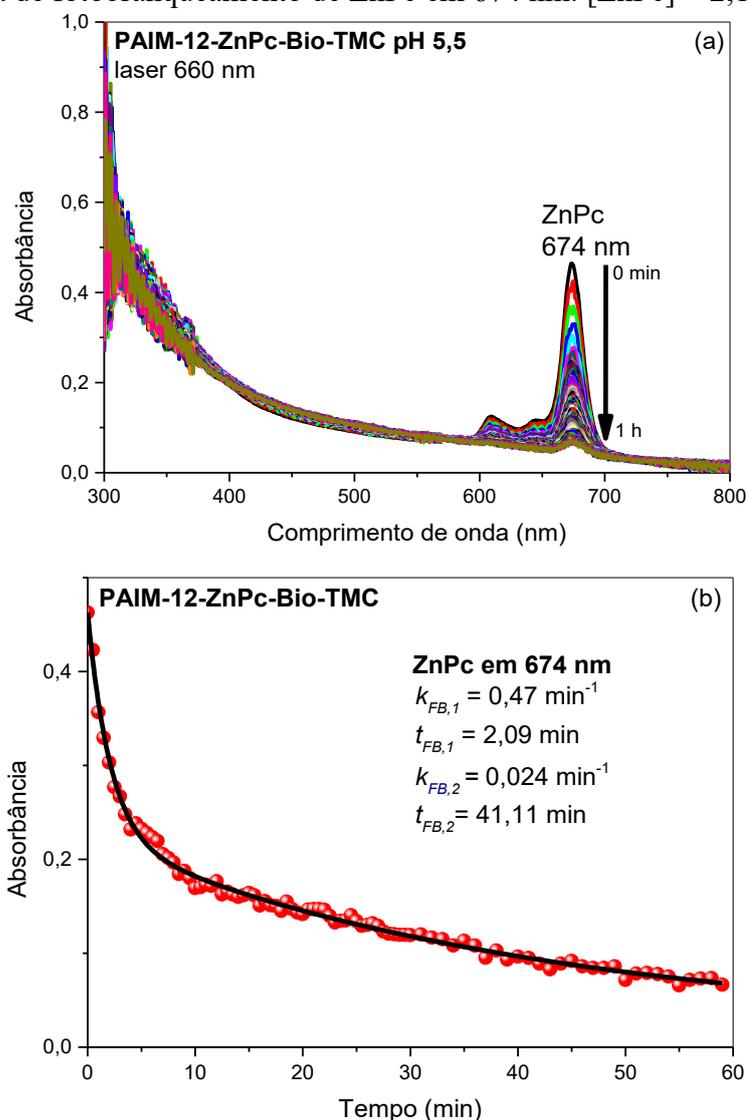


Tabela 8 – Constantes de velocidade de fotobranqueamento (k_{FB}) e rendimentos quânticos de fotobranqueamento (ϕ_{FB}) para ZnPc livre e conjugada.

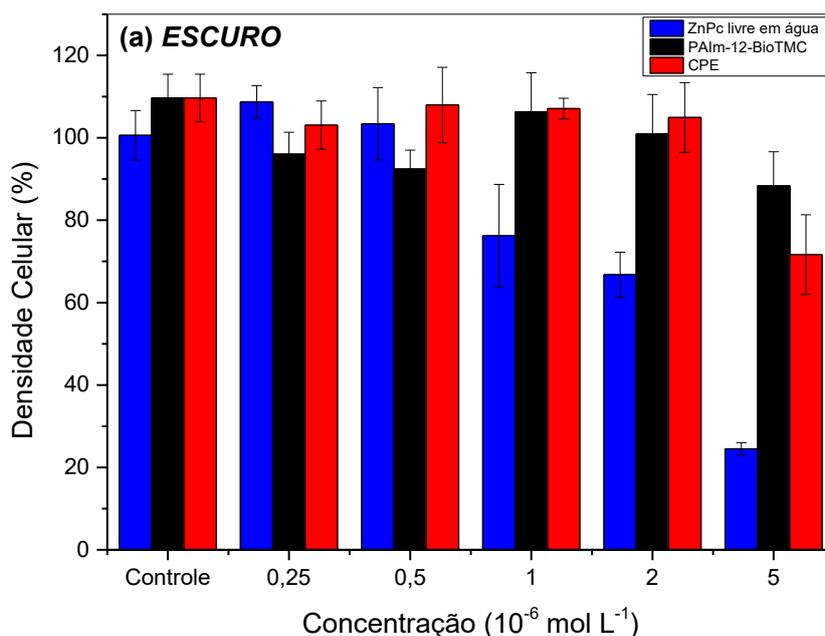
	ZnPc livre em etanol	PAIm-12-ZnPc-BioTMC
$k_{FB,1} (10^{-2} \text{ min}^{-1})$	1,14±0,03	47,70±2,29
$k_{FB,2} (10^{-2} \text{ min}^{-1})$	-	2,43±0,29
ϕ_{FB}	0,12	0,071 na 1ª etapa 0,0026 na 2ª etapa

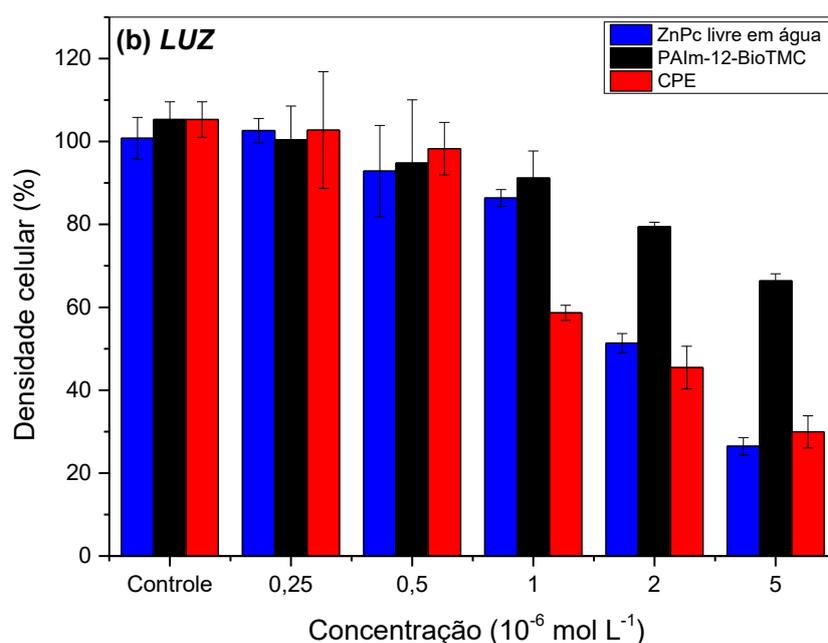
3.7.9 Testes biológicos *in vitro* contra melanoma B16F10

3.7.9.1 Ensaio colorimétrico de Sulforodamina B

O potencial do CPE em causar citotoxicidade *in vitro* contra células de melanoma do tipo B16F10 foi analisado no escuro e após 30 min de iluminação (sistema de LED *in vitro* – luz branca “Warm White” LK1490_M006, 55,3 J cm⁻²). A densidade celular após a realização dos testes foi quantificada a partir do ensaio colorimétrico da Sulforodamina B. Os resultados obtidos estão dispostos na Figura 74.

Figura 74 – Densidade celular (%) de células de melanoma B16F10 na ausência (grupo controle) e na presença de diferentes concentrações (0,25-5 μM) de ZnPc livre em água (coluna azul), de PAIm-12-BioTMC (coluna preta) e de CPE (coluna vermelha), (a) no escuro e (b) na presença de luz branca (30 min, 55,3 J cm⁻²).





Analisando o comportamento das amostras no escuro (Figura 74a), pode-se perceber que não apresentaram efeito citotóxico nas menores concentrações ($0,25$ e $0,5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$), sendo que a partir de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$ a ZnPc em sua forma livre em solução aquosa começa a apresentar citotoxicidade significativa mesmo na ausência de fotoestímulo, chegando a provocar uma redução de densidade celular acima dos 75% na maior concentração ($5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Este resultado evidencia a impossibilidade de aplicação do FS em sua forma livre, devido ao potencial em causar dano às células saudáveis, uma vez que seu efeito citotóxico não é foto-dependente. Por outro lado, quando observamos o comportamento do grupo controle PAIm-12-BioTMC e do CPE, podemos perceber que os mesmos não apresentam citotoxicidade no escuro até a concentração de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, o que possibilitaria sua aplicação em condições que não excedam tal concentração. Para encerrar, salienta-se que o complexo polieletrólítico colaborou para uma redução da citotoxicidade da ZnPc no escuro, nas concentrações mais elevadas (de 1 a $5 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$).

Para as amostras que receberam 30 min de iluminação de luz branca ($55,3 \text{ J cm}^{-2}$, Figura 74b), efeito citotóxico significativo passou a ser observado a partir de $1 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, onde percebeu-se uma redução gradativa da densidade celular a medida em que a concentração das amostras de ZnPc livre em água e de CPE aumenta. Na concentração de $2 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$, que é a concentração de uso indicada segundo teste no escuro, o CPE apresentou o maior efeito

citotóxico em comparação com a ZnPc livre, causando uma redução de aproximadamente 55% da densidade celular, em comparação com 48% causados pela ZnPc livre. Nesta concentração, o conjugado polimérico PAIm-12-ZnPc causou redução de aproximadamente 20% do número de células de melanoma.

Quando os dois são comparados, é possível observar o papel da iluminação na ativação do FS inserido no CPE, fator fundamentalmente responsável pela ação fotodinâmica do mesmo. Na concentração ideal de aplicação do CPE, 2 μ M, pode-se dizer que o CPE foi capaz de reduzir mais da metade do número de células de melanoma, sem apresentar qualquer prejuízo às células no escuro, demonstrando aplicação segura (até o ponto em que os testes *in vitro* foram capazes de avaliar) e potencial para aplicações futuras em TFD.

CONCLUSÕES PARCIAIS

3.8

Na **Parte II** desta Tese de Doutorado obteve-se a partir da quitosana, o derivado TMC. A TMC foi caracterizada por RMN de ^1H , FT-IR, análise elementar, e titulação potenciométrica. A TMC foi funcionalizada com biotina formando a Bio-TMC, que foi caracterizada por FT-IR e RMN ^1H . O polímero PAIm-12 foi obtido sintetizado e caracterizado RMN ^1H , FT-IR, e titulação potenciométrica. A concentração agregacional crítica (cac) do PAIm-12 foi avaliada utilizando pireno como sonda de fluorescência, observando-se que os valores de cac diminuíram com o aumento do pH. Complexos polieletrólíticos contendo PAIm-12 e Bio-TMC foram obtidos, e possibilitaram a incorporação de Zn-Pc na forma monomérica. Os CPE apresentaram diâmetro hidrodinâmico de 100 nm, e potencial Zeta de +29,2 mV, enquanto os agregados de PAIm-12 mostraram tamanho médio em torno de 344 nm, com uma carga superficial positiva de +10,3 mV. O menor tamanho e o maior potencial zeta do CPE são fatores importantes para a estabilidade da partícula, e aplicações biológicas. Em adição, os complexos polieletrólíticos foram caracterizados por FT-IR, evidenciando a coordenação axial do zinco da ftalocianina com os grupos carboxilato do PAIm-12.

As propriedades fotofísicas da ftalocianina incorporada no CPE foram avaliadas, e verificou-se que as bandas características de absorção e de emissão do FS na forma monomérica estavam presentes. No CPE, o deslocamento de Stokes, $\Delta\nu$, para a Zn-Pc foi de 109 cm^{-1} , enquanto em etanol, o $\Delta\nu$ foi de 223 cm^{-1} . A diferença observada indica uma mudança do

ambiente do FS, indo em encontro com a formação axial do metal com ligantes presentes no polímero, em concordância com as análises de infravermelho. Em adição, o rendimento quântico de fluorescência da Zn-Pc no CPE diminuiu quase três vezes em relação ao etanol, enquanto o tempo de vida permaneceu praticamente inalterado.

A capacidade da ftalocianina em gerar EROS em etanol e CPE foi avaliada usando ABDA como sonda química, evidenciando a formação de EROs. Em etanol, tanto a degradação do ABDA como a do FS seguiram modelos cinéticos de 1ª ordem, enquanto no CPE tanto a fotodegradação do FS como a do ABDA seguiram modelos com duas etapas consecutivas de 1ª ordem. Ensaio usando azida como espécie supressora para oxigênio singlete e DMSO para radical hidroxila, indicaram que a degradação do ABDA é diretamente relacionada a formação de oxigênio singlete, enquanto a degradação do FS é dependente de radicais $\cdot\text{OH}$. Em adição, a formação de oxigênio singlete foi mais evidenciada em etanol, enquanto a formação das espécies radicalares aumentou no CPE, sendo que a mudança observada na geração das EROs pode ser explicada pela formação de complexos do FS e do CPE.

Os testes biológicos indicaram que o CPE foi capaz de reduzir significativamente a citotoxicidade da ZnPc no escuro, tornando segura sua aplicação até a concentração de 2×10^{-6} mol L⁻¹. Na presença de luz, o CPE foi capaz de reduzir mais da metade da quantidade de células de melanoma em uma única aplicação do tratamento, na mesma concentração mencionada.

De maneira geral, os resultados obtidos sugerem a obtenção de CPE capaz de solubilizar a ZnPc, e a formação de coordenação axial do zinco ao grupo carboxilato do polímero, levando a modificações nas propriedades fotofísicas de interesse para aplicações fotodinâmicas como o rendimento quântico de fluorescência, rendimento de fotobranqueamento, e geração de espécies reativas de oxigênio.

CONCLUSÕES GERAIS E PERSPECTIVAS

A presente Tese de doutorado abordou a síntese, caracterização e aplicação biológica *in vitro* de dois sistemas planejados para encapsulamento de FS e aplicação em fototerapias para o tratamento de câncer. O primeiro sistema, um conjugado obtido a partir do emprego de nanopartículas de ouro aniônicas eletrostaticamente combinadas ao FS AM e recobertas com o polímero HTTC, HTCC-AM-AuNPs, e o segundo, um CPE obtido a partir da combinação dos polieletrólitos BioTMC e PAIm-12, para solubilização do FS ZnPc, PAIm-12-ZnPc-BioTMC. De forma geral, ambos os sistemas apresentaram pequeno tamanho (~150 nm e 100 nm, respectivamente) o que os torna compatíveis com direcionamento passivo por efeito EPR. Além disso, a biotina presente no CPE pode apresentar a capacidade de direcionamento ativo através do mesmo efeito, o que poderá ser alvo de investigação em futuros estudos *in vivo*. Ambos os sistemas também apresentaram potencial Zeta positivo, o que contribui para a estabilidade dos mesmos em meio aquoso.

É importante citar, também, que apesar da redução de algumas das propriedades fotofísicas dos FS uma vez encapsulados – como ϕ_F , por exemplo – as espécies fotoativadas se mostraram capazes de produzir EROs em quantidade suficiente para promover dano celular considerável a células de câncer, assim como foi observado através dos testes biológicos *in vitro*. No caso do conjugado HTCC-AM-AuNPs, testado contra células de câncer de mama MDA-MB231, o AM apresentou mesmo efeito citotóxico em relação àquele apresentado por sua forma livre, ainda que este tenha apresentado uma maior capacidade de geração de EROs do que aquele. Isso se explica, provavelmente, pela combinação entre AuNPs-FS, em que as nanopartículas contribuíram para elevar o efeito terapêutico do FS. Além disso, o recobrimento com a camada polimérica de HTCC contribuiu para a redução da toxicidade do AM no escuro, característica essencial para futuras aplicação *in vivo*. Para o CPE, testado contra células de melanoma B16F10, a aplicação do escuro se mostrou segura até a concentração de 2×10^{-6} mol L⁻¹, sendo que, mediante iluminação, esta concentração foi capaz de reduzir cerca de 55% da viabilidade celular.

Em suma, os dois sistemas propostos apresentaram propriedades fotoquímicas e fototerapêuticas interessantes, mostrando-se promissores para futuras aplicações biológicas *in vivo*, tema que ainda deve ser estudado.

REFERÊNCIAS

- [1] J. Moan e Q. Peng, “Chapter 1: An outline of the history of PDT”, em *Photodynamic Therapy: Comprehensive series in photochemistry and photobiology*, vol. 2, Nantes, França: Thierry Patrice, 2003, p. 284.
- [2] M. H. Abdel-Kader, “History of Photodynamic Therapy”, em *Photodynamic Therapy: From Theory to Application*, Novo Cairo, Egito: Mahmoud H. Abdel-Kader, 2014, p. 312.
- [3] H. Shi e P. J. Sadler, “How promising is phototherapy for cancer?”, *Br J Cancer*, vol. 123, nº 6, p. 871–873, set. 2020, doi: 10.1038/s41416-020-0926-3.
- [4] S. B. Brown, E. A. Brown, e I. Walker, “The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment”, *The Lancet Oncology*, vol. 5, nº 8, p. 497–508, ago. 2004, doi: 10.1016/S1470-2045(04)01529-3.
- [5] D. E. J. G. J. Dolmans, D. Fukumura, e R. K. Jain, “Photodynamic therapy for cancer”, *Nat Rev Cancer*, vol. 3, nº 5, p. 380–387, maio 2003, doi: 10.1038/nrc1071.
- [6] F. I. Simplicio, F. Maionchi, e N. Hioka, “Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos”, *Quím. Nova*, vol. 25, nº 5, p. 801–807, set. 2002, doi: 10.1590/S0100-40422002000500016.
- [7] J. C. Kennedy, “Introduction”, em *Photodynamic Therapy with ALA: A Clinical Handbook*, Cambridge: RSC Publishing, 2006, p. 276.
- [8] B. Valeur, *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*, vol. 8. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2002.
- [9] B. Wardle, “Light Absorption and Electronically-Excited States”, em *Principles and Applications of Photochemistry*, Padstow: WILEY-VCH Verlag GmbH, 2009, p. 250.
- [10] J. R. Lakowicz, “Introduction to Fluorescence”, em *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Singapore: Springer, 2006, p. 954.
- [11] B. W. Henderson e T. J. Dougherty, “How Does Photodynamic Therapy Work?”, *Photochem & Photobiology*, vol. 55, nº 1, p. 145–157, jan. 1992, doi: 10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x.
- [12] A. P. Gerola, “Estudos Fotofísicos e Fotodinâmicos Da Clorofila a e Derivados Formulados Em Micelas Poliméricas e Lipossomos”, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2013.
- [13] J. D. Spikes, “Photosensitization”, em *The Science of Photobiology*, New York: Plenum Publishing Corporation, 1977.
- [14] A. E. D. H. Machado, “Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas”, *Quím. Nova*, vol. 23, nº 2, p. 237–243, abr. 2000, doi: 10.1590/S0100-40422000000200015.
- [15] T. H. Foster, R. S. Murant, R. G. Bryant, R. S. Knox, S. L. Gibson, e R. Hilf, “Oxygen Consumption and Diffusion Effects in Photodynamic Therapy”, *Radiation Research*, vol. 126, nº 3, p. 296, jun. 1991, doi: 10.2307/3577919.
- [16] T. Sitnik, J. Hampton, e B. Henderson, “Reduction of tumour oxygenation during and after photodynamic therapy in vivo: effects of fluence rate”, *Br J Cancer*, vol. 77, nº 9, p. 1386–1394, maio 1998, doi: 10.1038/bjc.1998.231.
- [17] P. Atkins e L. Jones, *Princípios de Química - Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente*, 3º ed. Porto Alegre: Bookman.
- [18] D. R. Kearns, “Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen”, *Chem. Rev.*, vol. 71, nº 4, p. 395–427, ago. 1971, doi: 10.1021/cr60272a004.

- [19] W. T. Borden, R. Hoffmann, T. Stuyver, e B. Chen, “Dioxygen: What Makes This Triplet Diradical Kinetically Persistent?”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 139, n° 26, p. 9010–9018, jul. 2017, doi: 10.1021/jacs.7b04232.
- [20] B. Q. Spring, I. Rizvi, N. Xu, e T. Hasan, “The role of photodynamic therapy in overcoming cancer drug resistance”, *Photochem Photobiol Sci*, vol. 14, n° 8, p. 1476–1491, ago. 2015, doi: 10.1039/c4pp00495g.
- [21] R. K. Jain, “Delivery of molecular and cellular medicine to solid tumors”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 64, p. 353–365, dez. 2012, doi: 10.1016/j.addr.2012.09.011.
- [22] R. K. Jain, “The next frontier of molecular medicine: Delivery of therapeutics”, *Nat Med*, vol. 4, n° 6, p. 655–657, jun. 1998, doi: 10.1038/nm0698-655.
- [23] K. Plaetzer, B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr, e T. Kiesslich, “Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects”, *Lasers Med Sci*, vol. 24, n° 2, p. 259–268, mar. 2009, doi: 10.1007/s10103-008-0539-1.
- [24] A. Juzeniene e K. P. Nielsen, “Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy”, *J Env. Pathol Toxicol Oncol*, vol. 25, p. 7–28, 2006.
- [25] D. Wöhrle, “Phthalocyanines: Properties and applications. Edited by C. C. Leznoff and A. B. P. Lever”, VCH, Weinheim. Volume 1, 1989, 436 pp., ISBN 3-527-26955-X; Volume 2, 1993, 305 pp., DM 268, ISBN 3-527-89544-2”, *Advanced Materials*, vol. 5, n° 12, p. 942–943, dez. 1993, doi: 10.1002/adma.19930051217.
- [26] L. Brancalione e H. Moseley, “Laser and Non-laser Light Sources for Photodynamic Therapy”, *Lasers Med Sci*, vol. 17, n° 3, p. 173–186, ago. 2002, doi: 10.1007/s101030200027.
- [27] H. S. Han e K. Y. Choi, “Advances in Nanomaterial-Mediated Photothermal Cancer Therapies: Toward Clinical Applications”, *Biomedicines*, vol. 9, n° 3, p. 305, mar. 2021, doi: 10.3390/biomedicines9030305.
- [28] D. G. Meeker *et al.*, “Synergistic Photothermal and Antibiotic Killing of Biofilm-Associated *Staphylococcus aureus* Using Targeted Antibiotic-Loaded Gold Nanoconstructs”, *ACS Infect. Dis.*, vol. 2, n° 4, p. 241–250, abr. 2016, doi: 10.1021/acsinfecdis.5b00117.
- [29] G. Eskiizmir, “Nanomaterials: promising structures for the management of oral cancer”, em *Nanostructures for Oral Medicine*, 2017, p. 511–544.
- [30] D. Lapotko, “Therapy with gold nanoparticles and lasers: what really kills the cells?”, *Nanomedicine*, vol. 4, n° 3, p. 253–256, abr. 2009, doi: 10.2217/nnm.09.2.
- [31] S. Link e M. A. El-Sayed, “Shape and size dependence of radiative, non-radiative and photothermal properties of gold nanocrystals”, *International Reviews in Physical Chemistry*, vol. 19, n° 3, p. 409–453, jul. 2000, doi: 10.1080/01442350050034180.
- [32] R. S. Riley e E. S. Day, “Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: applications and opportunities for multimodal cancer treatment”, *WIREs Nanomed Nanobiotechnol*, vol. 9, n° 4, p. e1449, jul. 2017, doi: 10.1002/wnan.1449.
- [33] M. Kim, J. Lee, e J. Nam, “Plasmonic Photothermal Nanoparticles for Biomedical Applications”, *Advanced Science*, vol. 6, n° 17, p. 1900471, set. 2019, doi: 10.1002/advs.201900471.
- [34] H. B. Jeon, P. V. Tsalu, e J. W. Ha, “Shape Effect on the Refractive Index Sensitivity at Localized Surface Plasmon Resonance Inflection Points of Single Gold Nanocubes with Vertices”, *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, p. 13635, set. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-50032-3.
- [35] X. Huang, S. Neretina, e M. A. El-Sayed, “Gold Nanorods: From Synthesis and Properties to Biological and Biomedical Applications”, *Advanced Materials*, vol. 21, n° 48, p. 4880–4910, dez. 2009, doi: 10.1002/adma.200802789.

- [36] C. Kong e X. Chen, “Combined Photodynamic and Photothermal Therapy and Immunotherapy for Cancer Treatment: A Review”, vol. 17, p. 6427–6446, 2022, doi: 10.2147/IJN.S388996.
- [37] X. Wei *et al.*, “Combined Photodynamic and Photothermal Therapy Using Cross-Linked Polyphosphazene Nanospheres Decorated with Gold Nanoparticles”, *ACS Appl. Nano Mater.*, vol. 1, n° 7, p. 3663–3672, jul. 2018, doi: 10.1021/acsanm.8b00776.
- [38] J. Hu *et al.*, “Cell Membrane-Inspired Polymeric Vesicles for Combined Photothermal and Photodynamic Prostate Cancer Therapy”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 12, n° 38, p. 42511–42520, set. 2020, doi: 10.1021/acsami.0c11636.
- [39] F. Zeng, K. Peng, L. Han, e J. Yang, “Photothermal and Photodynamic Therapies via NIR-Activated Nanoagents in Combating Alzheimer’s Disease”, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, vol. 7, n° 8, p. 3573–3585, ago. 2021, doi: 10.1021/acsbiomaterials.1c00605.
- [40] J. R. Perussi, “Inativação fotodinâmica de microrganismos”, *Quím. Nova*, vol. 30, n° 4, p. 988–994, ago. 2007, doi: 10.1590/S0100-40422007000400039.
- [41] A. Stájer, S. Kajári, M. Gajdács, A. Musah-Eroje, e Z. Baráth, “Utility of Photodynamic Therapy in Dentistry: Current Concepts”, *Dentistry Journal*, vol. 8, n° 2, p. 43, maio 2020, doi: 10.3390/dj8020043.
- [42] A. Upadhyay, “Cancer: An unknown territory; rethinking before going ahead”, *Genes & Diseases*, vol. 8, n° 5, p. 655–661, set. 2021, doi: 10.1016/j.gendis.2020.09.002.
- [43] M. D. O. Santos, F. C. D. S. D. Lima, L. F. L. Martins, J. F. P. Oliveira, L. M. D. Almeida, e M. D. C. Cancela, “Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025”, *Rev. Bras. Cancerol.*, vol. 69, n° 1, fev. 2023, doi: 10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700.
- [44] E. C. Aniogo, B. Plackal Adimuriyil George, e H. Abrahamse, “The role of photodynamic therapy on multidrug resistant breast cancer”, *Cancer Cell Int*, vol. 19, n° 1, p. 91, dez. 2019, doi: 10.1186/s12935-019-0815-0.
- [45] S. Łukasiewicz, M. Czezelewski, A. Forma, e J. Baj, “Breast Cancer—Epidemiology, Risk Factors, Classification, Prognostic Markers, and Current Treatment Strategies—An Updated Review”, vol. 17, 2021.
- [46] N. Harbeck *et al.*, “Breast cancer”, *Nat Rev Dis Primers*, vol. 5, n° 1, p. 66, set. 2019, doi: 10.1038/s41572-019-0111-2.
- [47] P. C. Huber, C. H. Maruiama, e W. P. Almeida, “Glicoproteína-P, resistência a múltiplas drogas (MDR) e relação estrutura-atividade de moduladores”, *Quím. Nova*, vol. 33, n° 10, p. 2148–2154, 2010, doi: 10.1590/S0100-40422010001000027.
- [48] V. Goler-Baron e Y. G. Assaraf, “Overcoming Multidrug Resistance via Photodestruction of ABCG2-Rich Extracellular Vesicles Sequestering Photosensitive Chemotherapeutics”, *PLoS ONE*, vol. 7, n° 4, p. e35487, abr. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0035487.
- [49] Y. Yang, W. Cui, e J. Zhao, “Synergistic treatment of doxorubicin-resistant breast cancer by the combination of chemotherapy and photodynamic therapy”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 648, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.129167>.
- [50] G. V. Long, S. M. Swetter, A. M. Menzies, J. E. Gershenwald, e R. A. Scolyer, “Cutaneous melanoma”, *The Lancet*, vol. 402, 2023, doi: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(23\)00821-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(23)00821-8).
- [51] C. Papageorgiou, Z. Apalla, S. Manoli, K. Lallas, E. Vakirlis, e A. Lallas, “Melanoma: Staging and Follow-Up”, *Dermatol Pract Concept*, 2021, doi: 10.5826/dpc.11S1a162S.
- [52] J. Q. Tang, X. Y. Hou, e C. S. Yang, “Recent developments in nanomedicine for melanoma treatment.”, *Int J Cancer*, vol. 141, p. 646–653, 2017, doi: 10.1002/ijc.30708.

- [53] C. Naidoo, C. A. Kruger, e H. Abrahamse, “Photodynamic Therapy for Metastatic Melanoma Treatment: A Review”, *Technol Cancer Res Treat*, vol. 17, p. 153303381879179, jan. 2018, doi: 10.1177/1533033818791795.
- [54] W. Jiang, M. Liang, Q. Lei, G. Li, e S. Wu, “The Current Status of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment”, *Cancers*, vol. 15, n° 3, p. 585, jan. 2023, doi: 10.3390/cancers15030585.
- [55] S. Kwiatkowski *et al.*, “Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations”, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, vol. 106, p. 1098–1107, out. 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.07.049.
- [56] J. Kou, D. Dou, e L. Yang, “Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications”, *Oncotarget*, vol. 8, n° 46, p. 81591–81603, out. 2017, doi: 10.18632/oncotarget.20189.
- [57] Y.-E. K. Lee e R. Kopelman, “Polymeric Nanoparticles for Photodynamic Therapy”, em *Biomedical Nanotechnology: Methods and Protocols*, New York: Springer Science+Business Media, 2011.
- [58] E. J. Hong, D. G. Choi, e M. S. Shim, “Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials”, *Acta Pharmaceutica Sinica B*, vol. 6, n° 4, p. 297–307, jul. 2016, doi: 10.1016/j.apsb.2016.01.007.
- [59] Y.-X. Li, Y. Liu, H. Wang, Z.-T. Li, e D.-W. Zhang, “Water-Soluble Porphyrin-Based Nanoparticles Derived from Electrostatic Interaction for Enhanced Photodynamic Therapy”, *ACS Appl. Bio Mater.*, p. 881–888, 2022.
- [60] I. S. Pires, Q. T. O’Boyle, C. J. Munoz, C. Savla, P. Cabrales, e A. F. Palmer, “Enhanced Photodynamic Therapy Using the Apohemoglobin-Haptoglobin Complex as a Carrier of Aluminum Phthalocyanine”, *ACS Appl. Bio Mater.*, vol. 3, n° 7, p. 4495–4506, jul. 2020, doi: 10.1021/acsabm.0c00450.
- [61] R. Duncan, “Polymer conjugates for tumour targeting and intracytoplasmic delivery. The EPR effect as a common gateway?”, *Pharmaceutical Science & Technology Today*, vol. 2, n° 11, p. 441–449, nov. 1999, doi: 10.1016/S1461-5347(99)00211-4.
- [62] J. Wu, “The Enhanced Permeability and Retention (EPR) Effect: The Significance of the Concept and Methods to Enhance Its Application”, *JPM*, vol. 11, n° 8, p. 771, ago. 2021, doi: 10.3390/jpm11080771.
- [63] D. Kozlova e M. Eppele, “Biological targeting with nanoparticles: state of the art”, *BioNanoMaterials*, vol. 14, n° 3–4, jan. 2013, doi: 10.1515/bnm-2013-0020.
- [64] A. Nel, E. Ruoslahti, e H. Meng, “New Insights into ‘Permeability’ as in the Enhanced Permeability and Retention Effect of Cancer Nanotherapeutics”, *ACS Nano*, vol. 11, n° 10, p. 9567–9569, out. 2017, doi: 10.1021/acsnano.7b07214.
- [65] Y. Shi, R. Van Der Meel, X. Chen, e T. Lammers, “The EPR effect and beyond: Strategies to improve tumor targeting and cancer nanomedicine treatment efficacy”, *Theranostics*, vol. 10, n° 17, p. 7921–7924, 2020, doi: 10.7150/thno.49577.
- [66] M. Jurczyk, K. Jelonek, M. Musiał-Kulik, A. Beberok, D. Wrzeńskiok, e J. Kasperczyk, “Single- versus Dual-Targeted Nanoparticles with Folic Acid and Biotin for Anticancer Drug Delivery”, *Pharmaceutics*, vol. 13, n° 3, p. 326, mar. 2021, doi: 10.3390/pharmaceutics13030326.
- [67] T.-H. Tseng, C.-Y. Chen, W.-C. Wu, e C.-Y. Chen, “Targeted and oxygen-enriched polymeric micelles for enhancing photodynamic therapy”, *Nanotechnology*, vol. 32, n° 36, p. 365102, set. 2021, doi: 10.1088/1361-6528/ac020d.
- [68] C. Conte, S. Maiolino, D. S. Pelloso, A. Miro, F. Ungaro, e F. Quaglia, “Polymeric Nanoparticles for Cancer Photodynamic Therapy”, em *Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine*, vol. 370, S. Sortino, Org., em Topics in Current

- Chemistry, vol. 370. , Cham: Springer International Publishing, 2016, p. 61–112. doi: 10.1007/978-3-319-22942-3_3.
- [69] L. B. Silva, K. A. D. F. Castro, C. E. A. Botteon, C. L. P. Oliveira, R. S. Da Silva, e P. D. Marcato, “Hybrid Nanoparticles as an Efficient Porphyrin Delivery System for Cancer Cells to Enhance Photodynamic Therapy”, *Front. Bioeng. Biotechnol.*, vol. 9, p. 679128, set. 2021, doi: 10.3389/fbioe.2021.679128.
- [70] M. C. M. Laranjeira e V. T. D. Fávere, “Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico”, *Quím. Nova*, vol. 32, nº 3, p. 672–678, 2009, doi: 10.1590/S0100-40422009000300011.
- [71] H. S. R. C. Silva, K. S. C. R. D. Santos, e E. I. Ferreira, “Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços”, *Quím. Nova*, vol. 29, nº 4, p. 776–785, jul. 2006, doi: 10.1590/S0100-40422006000400026.
- [72] M. Z. Karagozlu e S.-K. Kim, “Anticancer Effects of Chitin and Chitosan Derivatives”, em *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 72, Elsevier, 2014, p. 215–225. doi: 10.1016/B978-0-12-800269-8.00012-9.
- [73] A. Martins, S. Facchi, H. Follmann, A. Pereira, A. Rubira, e E. Muniz, “Antimicrobial Activity of Chitosan Derivatives Containing N-Quaternized Moieties in Its Backbone: A Review”, *IJMS*, vol. 15, nº 11, p. 20800–20832, nov. 2014, doi: 10.3390/ijms151120800.
- [74] D.-H. Ngo e S.-K. Kim, “Antioxidant Effects of Chitin, Chitosan, and Their Derivatives”, em *Advances in Food and Nutrition Research*, vol. 73, Elsevier, 2014, p. 15–31. doi: 10.1016/B978-0-12-800268-1.00002-0.
- [75] I.-Y. Kim *et al.*, “Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications”, *Biotechnology Advances*, vol. 26, nº 1, p. 1–21, jan. 2008, doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.009.
- [76] G. Chen, Y. Zhao, Y. Xu, C. Zhu, T. Liu, e K. Wang, “Chitosan nanoparticles for oral photothermally enhanced photodynamic therapy of colon cancer”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 589, p. 119763, nov. 2020, doi: 10.1016/j.ijpharm.2020.119763.
- [77] S. Belali, A. R. Karimi, e M. Hadizadeh, “Cell-specific and pH-sensitive nanostructure hydrogel based on chitosan as a photosensitizer carrier for selective photodynamic therapy”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 110, p. 437–448, abr. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.169.
- [78] H. V. Sæther, H. K. Holme, G. Maurstad, O. Smidsrød, e B. T. Stokke, “Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 74, nº 4, p. 813–821, nov. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.04.048.
- [79] P.-F. Yang e C.-K. Lee, “Hyaluronic acid interaction with chitosan-conjugated magnetite particles and its purification”, *Biochemical Engineering Journal*, vol. 33, nº 3, p. 284–289, mar. 2007, doi: 10.1016/j.bej.2006.11.010.
- [80] J. Dutkiewicz, M. Tuora, L. Judkiewicz, e R. Ciszewski, “New Forms of Chitosan Polyelectrolyte Complexes”, 1992, doi: 10.1007/978-94-011-5942-5_56.
- [81] V. K. Mourya e N. N. Inamdar, “Trimethyl chitosan and its applications in drug delivery”, *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 20, nº 5, p. 1057–1079, maio 2009, doi: 10.1007/s10856-008-3659-z.
- [82] S. P. Facchi *et al.*, “Preparation and cytotoxicity of N-modified chitosan nanoparticles applied in curcumin delivery”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 87, p. 237–245, jun. 2016, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.02.063.
- [83] J. H. Hamman, M. Stander, e A. F. Kotzé, “Effect of the degree of quaternisation of N-trimethyl chitosan chloride on absorption enhancement: in vivo evaluation in rat nasal epithelia”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 232, nº 1–2, p. 235–242, jan. 2002, doi: 10.1016/S0378-5173(01)00914-0.

- [84] QN. Nguyen-Trinh, N. Trinh, H. Nguyen, e V. Long, “Preparation of Trimethyl Chitosan-Based Polyion Complex Micelle as Drug Delivery System for Cancer Therapy”, *8th International Conference on the Development of Biomedical Engineering in Vietnam*, vol. 85, 2021, doi: https://doi.org/10.1007/978-3-030-75506-5_23.
- [85] H. Hu *et al.*, “Albumin coated trimethyl chitosan-based targeting delivery platform for photothermal/chemo-synergistic cancer therapy”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 241, p. 116335, ago. 2020, doi: [10.1016/j.carbpol.2020.116335](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116335).
- [86] P. Bangde, T. Pant, G. Gaikwad, R. Jain, e P. Dandekar, “Trimethyl chitosan coated palladium nanoparticles as a photothermal agent and its in vitro evaluation in 2D and 3D model of breast cancer cells”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 211, 2022, doi: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2021.112287>.
- [87] S.-D. Li *et al.*, “Synthesis and characterization of chitosan quaternary ammonium salt and its application as drug carrier for ribavirin”, *Drug Delivery*, vol. 21, n° 7, p. 548–552, nov. 2014, doi: [10.3109/10717544.2013.853708](https://doi.org/10.3109/10717544.2013.853708).
- [88] A. Bahmanpour, M. Ghaffari, P. B. Milan, F. Moztafzadeh, e M. Mozafari, “Synthesis and characterization of thermosensitive hydrogel based on quaternized chitosan for intranasal delivery of insulin”, *Biotech and App Biochem*, vol. 68, n° 2, p. 247–256, abr. 2021, doi: [10.1002/bab.1917](https://doi.org/10.1002/bab.1917).
- [89] G. Ren, Y. He, C. Liu, F. Ni, X. Luo, e J. Shi, “Encapsulation of curcumin in ZEIN-HTCC complexes: Physicochemical characterization, in vitro sustained release behavior and encapsulation mechanism”, vol. 55, 2022.
- [90] S. Shu, L. Sun, X. Zhang, Z. Wu, Z. Wang, e C. Li, “Polysaccharides-based polyelectrolyte nanoparticles as protein drugs delivery system”, *J Nanopart Res*, vol. 13, n° 9, p. 3657–3670, set. 2011, doi: [10.1007/s11051-011-0284-4](https://doi.org/10.1007/s11051-011-0284-4).
- [91] P.-P. Lv, W. Wei, H. Yue, T.-Y. Yang, L.-Y. Wang, e G.-H. Ma, “Porous Quaternized Chitosan Nanoparticles Containing Paclitaxel Nanocrystals Improved Therapeutic Efficacy in Non-Small-Cell Lung Cancer after Oral Administration”, *Biomacromolecules*, vol. 12, n° 12, p. 4230–4239, dez. 2011, doi: [10.1021/bm2010774](https://doi.org/10.1021/bm2010774).
- [92] W. Wang, P. Zhang, W. Shan, J. Gao, e W. Liang, “A novel chitosan-based thermosensitive hydrogel containing doxorubicin liposomes for topical cancer therapy”, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 24, n° 14, p. 1649–1659, out. 2013, doi: [10.1080/09205063.2013.789357](https://doi.org/10.1080/09205063.2013.789357).
- [93] Y.-C. Chuang, H.-L. Lee, J.-F. Chiou, e L.-W. Lo, “Recent Advances in Gold Nanomaterials for Photothermal Therapy”, *JNT*, vol. 3, n° 2, p. 117–131, jun. 2022, doi: [10.3390/jnt3020008](https://doi.org/10.3390/jnt3020008).
- [94] J. B. Vines, J.-H. Yoon, N.-E. Ryu, D.-J. Lim, e H. Park, “Gold Nanoparticles for Photothermal Cancer Therapy”, *Front. Chem.*, vol. 7, p. 167, abr. 2019, doi: [10.3389/fchem.2019.00167](https://doi.org/10.3389/fchem.2019.00167).
- [95] S. M. Amini, S. Kharrazi, M. Hadizadeh, M. Fateh, e R. Saber, “Effect of gold nanoparticles on photodynamic efficiency of 5-aminolevulinic acid photosensitizer in epidermal carcinoma cell line: an in vitro study”, *IET nanobiotechnol.*, vol. 7, n° 4, p. 151–156, dez. 2013, doi: [10.1049/iet-nbt.2013.0021](https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2013.0021).
- [96] E. Darabpour, N. Kashef, S. M. Amini, S. Kharrazi, e G. E. Djavid, “Fast and effective photodynamic inactivation of 4-day-old biofilm of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* using methylene blue-conjugated gold nanoparticles”, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, vol. 37, p. 134–140, fev. 2017, doi: [10.1016/j.jddst.2016.12.007](https://doi.org/10.1016/j.jddst.2016.12.007).
- [97] A. Neshastehriz, S. M. Amini, A. Mohammadi, S. R. Mahdavi, V. P. Mahabadi, e A. Akbari, “In-vitro investigation of green synthesized gold nanoparticle’s role in combined

- photodynamic and radiation therapy of cancerous cells”, *Adv. Nat. Sci: Nanosci. Nanotechnol.*, vol. 11, 2020, doi: 10.1088/2043-6254/abb8c7.
- [98] A. Khan, Khan, Azam, e Alam, “Gold nanoparticles enhance methylene blue-induced photodynamic therapy: a novel therapeutic approach to inhibit *Candida albicans* biofilm”, *IJN*, p. 3245, jun. 2012, doi: 10.2147/IJN.S31219.
- [99] J. P. Tardivo *et al.*, “Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications”, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, vol. 2, n° 3, p. 175–191, set. 2005, doi: 10.1016/S1572-1000(05)00097-9.
- [100] B. H. Vilsinski *et al.*, “Photophysics and drug delivery behavior of methylene blue into Arabic-gum based hydrogel matrices”, *Materials Today Communications*, vol. 26, p. 101889, mar. 2021, doi: 10.1016/j.mtcomm.2020.101889.
- [101] H. Yen *et al.*, “Positively charged gold nanoparticles capped with folate quaternary chitosan: Synthesis, cytotoxicity, and uptake by cancer cells”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 183, p. 140–150, mar. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.11.096.
- [102] B. Fan *et al.*, “Positively Charged-Amylose-Entangled Au-Nanoparticles Acting as Protein Carriers and Potential Adjuvants to SARS-CoV-2 Subunit Vaccines”, vol. 15, p. 29982–29997, 2023, doi: <https://doi.org/10.1021/acsami.3c05295>.
- [103] F. O. M. D. S. Abreu, A. M. Castro, P. V. Silva, L. G. Cavalcante, A. P. D. Nascimento, e J. E. X. D. Matos, “Propriedades e Características da Quitosana Obtida a Partir do Exoesqueleto de Caranguejo-Uçá Utilizando Radiação de Micro-Ondas”, *Polímeros*, vol. 23, n° 5, p. 630–635, 2013, doi: 10.4322/polimeros.2013.042.
- [104] A.-A. A. Abdel-Azim, A. M. Atta, M. S. Farahat, e W. Y. Boutros, “Determination of intrinsic viscosity of polymeric compounds through a single specific viscosity measurement”, *Polymer*, vol. 39, n° 26, p. 6827–6833, dez. 1998, doi: 10.1016/S0032-3861(98)00184-0.
- [105] M. Rinaudo, M. Milas, e P. L. Dung, “Characterization of chitosan. Influence of ionic strength and degree of acetylation on chain expansion”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 15, n° 5, p. 281–285, out. 1993, doi: 10.1016/0141-8130(93)90027-J.
- [106] M. Lavertu *et al.*, “A validated ¹H NMR method for the determination of the degree of deacetylation of chitosan”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, vol. 32, n° 6, p. 1149–1158, ago. 2003, doi: 10.1016/S0731-7085(03)00155-9.
- [107] J. Brugnerotto, J. Lizardi, F. M. Goycoolea, W. Argüelles-Monal, J. Desbrières, e M. Rinaudo, “An infrared investigation in relation with chitin and chitosan characterization”, *Polymer*, vol. 42, n° 8, p. 3569–3580, abr. 2001, doi: 10.1016/S0032-3861(00)00713-8.
- [108] V. T. Fávere, H. G. Riella, e S. D. Rosa, “Cloreto de n-(2-hidroxil) propil-3-trimetil amônio quitosana como adsorvente de corantes reativos em solução aquosa”, *Quím. Nova*, vol. 33, n° 7, p. 1476–1481, 2010, doi: 10.1590/S0100-40422010000700010.
- [109] S. Rosa, M. C. M. Laranjeira, H. G. Riella, e V. T. Fávere, “Cross-linked quaternary chitosan as an adsorbent for the removal of the reactive dye from aqueous solutions”, *Journal of Hazardous Materials*, vol. 155, n° 1–2, p. 253–260, jun. 2008, doi: 10.1016/j.jhazmat.2007.11.059.
- [110] S. Rathinam, S. Solodova, I. Kristjánisdóttir, M. Á. Hjálmarsdóttir, e M. Másson, “The antibacterial structure-activity relationship for common chitosan derivatives”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 165, p. 1686–1693, dez. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.09.200.
- [111] J. Turkevich, “Colloidal gold. Part I: Historical and preparative aspects, morphology and structure”, *Gold Bull*, vol. 18, n° 3, p. 86–91, set. 1985, doi: 10.1007/BF03214690.

- [112] J. Kimling, M. Maier, B. Okenve, V. Kotaidis, H. Ballot, e A. Plech, “Turkevich Method for Gold Nanoparticle Synthesis Revisited”, *J. Phys. Chem. B*, vol. 110, n° 32, p. 15700–15707, ago. 2006, doi: 10.1021/jp061667w.
- [113] X. Liu, M. Atwater, J. Wang, e Q. Huo, “Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 58, n° 1, p. 3–7, jul. 2007, doi: 10.1016/j.colsurfb.2006.08.005.
- [114] G. A. Shahinyan, A. Yu. Amirbekyan, e S. A. Markarian, “Photophysical properties of methylene blue in water and in aqueous solutions of dimethylsulfoxide”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 217, p. 170–175, jun. 2019, doi: 10.1016/j.saa.2019.03.079.
- [115] N. G. C. Astrath *et al.*, “Thermal-lens study of photochemical reaction kinetics”, *Opt. Lett.*, vol. 34, n° 22, p. 3460, nov. 2009, doi: 10.1364/OL.34.003460.
- [116] M. Y. Li, C. S. Cline, E. B. Koker, H. H. Carmichael, C. F. Chignell, e P. Bilski, “Quenching of Singlet Molecular Oxygen (1O₂) by Azide Anion in Solvent Mixtures”.
- [117] V. Vichai e K. Kirtikara, “Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening”, *Nat Protoc*, vol. 1, n° 3, p. 1112–1116, ago. 2006, doi: 10.1038/nprot.2006.179.
- [118] E. D. Freitas, C. F. Moura Jr., J. Kerwald, e M. M. Beppu, “An Overview of Current Knowledge on the Properties, Synthesis and Applications of Quaternary Chitosan Derivatives”, *Polymers*, vol. 12, n° 12, p. 2878, nov. 2020, doi: 10.3390/polym12122878.
- [119] S. Hirano, H. Seino, Y. Akiyama, e I. Nonaka, “Chitosan: A Biocompatible Material for Oral and Intravenous Administrations”, em *Progress in Biomedical Polymers*, C. G. Gebelein e R. L. Dunn, Orgs., Boston, MA: Springer US, 1990, p. 283–290. doi: 10.1007/978-1-4899-0768-4_28.
- [120] M. Aliabadi, R. Dastjerdi, e K. Kabiri, “HTCC-Modified Nanoclay for Tissue Engineering Applications: A Synergistic Cell Growth and Antibacterial Efficiency”, *BioMed Research International*, vol. 2013, p. 1–7, 2013, doi: 10.1155/2013/749240.
- [121] A. Hirai, H. Odani, e A. Nakajima, “Determination of degree of deacetylation of chitosan by 1H NMR spectroscopy”, *Polymer Bulletin*, vol. 26, n° 1, p. 87–94, 1991, doi: 10.1007/BF00299352.
- [122] N. Kubota e Y. Eguchi, “Facile Preparation of Water-Soluble N-Acetylated Chitosan and Molecular Weight Dependence of Its Water-Solubility”, *Polym J*, vol. 29, n° 2, p. 123–127, fev. 1997, doi: 10.1295/polymj.29.123.
- [123] B. Xiao *et al.*, “Synthesis and characterization of N-(2-hydroxy)propyl-3-trimethyl ammonium chitosan chloride for potential application in gene delivery”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 91, p. 168–174, mar. 2012, doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.10.053.
- [124] S.-H. Lim e S. M. Hudson, “Synthesis and antimicrobial activity of a water-soluble chitosan derivative with a fiber-reactive group”, *Carbohydrate Research*, vol. 339, n° 2, p. 313–319, jan. 2004, doi: 10.1016/j.carres.2003.10.024.
- [125] A. Geçer, N. Yıldız, A. Çalımlı, e B. Turan, “Trimethyl chitosan nanoparticles enhances dissolution of the poorly water soluble drug Candesartan-Cilexetil”, *Macromol. Res.*, vol. 18, n° 10, p. 986–991, out. 2010, doi: 10.1007/s13233-010-1004-0.
- [126] R. Tang, Y. Zhang, Y. Zhang, e Z. Yu, “Synthesis and characterization of chitosan based dye containing quaternary ammonium group”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 139, p. 191–196, mar. 2016, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.12.047.
- [127] S. Demirci, A. Alaslan, e T. Caykara, “Preparation, characterization and surface pKa values of poly(N-vinyl-2-pyrrolidone)/chitosan blend films”, *Applied Surface Science*, vol. 255, n° 11, p. 5979–5983, mar. 2009, doi: 10.1016/j.apsusc.2009.01.050.

- [128] M. Fan, Q. Hu, e K. Shen, “Preparation and structure of chitosan soluble in wide pH range”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 78, n° 1, p. 66–71, ago. 2009, doi: 10.1016/j.carbpol.2009.03.031.
- [129] T. Yui, K. Imada, K. Okuyama, Y. Obata, K. Suzuki, e K. Ogawa, “Molecular and crystal structure of the anhydrous form of chitosan”, *Macromolecules*, vol. 27, n° 26, p. 7601–7605, dez. 1994, doi: 10.1021/ma00104a014.
- [130] X. Li *et al.*, “Effect of the intramolecular hydrogen bond on the spectral and optical properties in chitosan oligosaccharide”, *Physica E: Low-dimensional Systems and Nanostructures*, vol. 69, p. 237–242, maio 2015, doi: 10.1016/j.physe.2015.01.043.
- [131] P. Chen *et al.*, “Quantifying the Contribution of the Dispersion Interaction and Hydrogen Bonding to the Anisotropic Elastic Properties of Chitin and Chitosan”, *Biomacromolecules*, vol. 23, n° 4, p. 1633–1642, abr. 2022, doi: 10.1021/acs.biomac.1c01488.
- [132] E. S. Hamborg e G. F. Versteeg, “Dissociation Constants and Thermodynamic Properties of Amines and Alkanolamines from (293 to 353) K”, *J. Chem. Eng. Data*, vol. 54, n° 4, p. 1318–1328, abr. 2009, doi: 10.1021/je800897v.
- [133] V. Borse e A. N. Konwar, “Synthesis and characterization of gold nanoparticles as a sensing tool for the lateral flow immunoassay development”, *Sensors International*, vol. 1, p. 100051, 2020, doi: 10.1016/j.sintl.2020.100051.
- [134] P. N. Njoki *et al.*, “Size Correlation of Optical and Spectroscopic Properties for Gold Nanoparticles”, *J. Phys. Chem. C*, vol. 111, n° 40, p. 14664–14669, out. 2007, doi: 10.1021/jp074902z.
- [135] J. Dong, P. L. Carpinone, G. Pyrgiotakis, P. Demokritou, e B. M. Moudgil, “Synthesis of Precision Gold Nanoparticles Using Turkevich Method”, *KONA*, vol. 37, n° 0, p. 224–232, jan. 2020, doi: 10.14356/kona.2020011.
- [136] M. Wuithschick *et al.*, “Turkevich in New Robes: Key Questions Answered for the Most Common Gold Nanoparticle Synthesis”, *ACS Nano*, vol. 9, n° 7, p. 7052–7071, jul. 2015, doi: 10.1021/acs.nano.5b01579.
- [137] T. V. Verissimo, N. T. Santos, J. R. Silva, R. B. Azevedo, A. J. Gomes, e C. N. Lunardi, “In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy”, *Materials Science and Engineering: C*, vol. 65, p. 199–204, ago. 2016, doi: 10.1016/j.msec.2016.04.030.
- [138] S. Zhang, Y. Moustafa, e Q. Huo, “Different Interaction Modes of Biomolecules with Citrate-Capped Gold Nanoparticles”, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 6, n° 23, p. 21184–21192, dez. 2014, doi: 10.1021/am506112u.
- [139] X. Zhang, M. R. Servos, e J. Liu, “Surface Science of DNA Adsorption onto Citrate-Capped Gold Nanoparticles”, *Langmuir*, vol. 28, n° 8, p. 3896–3902, fev. 2012, doi: 10.1021/la205036p.
- [140] W. Yang *et al.*, “Shape effects of gold nanoparticles in photothermal cancer therapy”, *Materials Today Sustainability*, vol. 13, p. 100078, set. 2021, doi: 10.1016/j.mtsust.2021.100078.
- [141] Q. Hu, Z. Huang, Y. Duan, Z. Fu, e Bin Liu, “Reprogramming Tumor Microenvironment with Photothermal Therapy”, *Bioconjugate Chem.*, vol. 31, n° 5, p. 1268–1278, maio 2020, doi: 10.1021/acs.bioconjchem.0c00135.
- [142] E. M. Klosowski *et al.*, “The photodynamic and direct actions of methylene blue on mitochondrial energy metabolism: A balance of the useful and harmful effects of this photosensitizer”, *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 153, p. 34–53, jun. 2020, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2020.04.015.

- [143] D.-Y. Seong e Y.-J. Kim, “Enhanced photodynamic therapy efficacy of methylene blue-loaded calcium phosphate nanoparticles”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 146, p. 34–43, maio 2015, doi: 10.1016/j.jphotobiol.2015.02.022.
- [144] B. R. Rabello *et al.*, “Singlet oxygen dosimetry using uric acid as a chemical probe: Systematic evaluation”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 238, p. 53–62, jun. 2012, doi: 10.1016/j.jphotochem.2012.04.012.
- [145] F. Fischer, G. Grasczew, H.-J. Sinn, W. Maier-Borst, W. J. Lorenz, e P. M. Schlag, “A chemical dosimeter for the determination of the photodynamic activity of photosensitizers”, *Clinica Chimica Acta*, vol. 274, n° 1, p. 89–104, jun. 1998, doi: 10.1016/S0009-8981(98)00045-X.
- [146] A. P. Gerola *et al.*, “Chemical determination of singlet oxygen from photosensitizers illuminated with LED: New calculation methodology considering the influence of photobleaching”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 232, p. 14–21, mar. 2012, doi: 10.1016/j.jphotochem.2012.01.018.
- [147] J. R. Harbour e S. L. Issler, “Involvement of the azide radical in the quenching of singlet oxygen by azide anion in water”, *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 104, n° 3, p. 903–905, fev. 1982, doi: 10.1021/ja00367a066.
- [148] M. G. Steiner e C. F. Babbs, “Quantitation of the hydroxyl radical by reaction with dimethyl sulfoxide”, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 278, n° 2, p. 478–481, maio 1990, doi: 10.1016/0003-9861(90)90288-A.
- [149] G. R. Buettner, Th. P. Doherty, e Th. D. Bannister, “Hydrogen peroxide and hydroxyl radical formation by methylene blue in the presence of ascorbic acid”, *Radiat Environ Biophys*, vol. 23, n° 4, p. 235–243, dez. 1984, doi: 10.1007/BF01407595.
- [150] P. Skehan *et al.*, “New Colorimetric Cytotoxicity Assay for Anticancer-Drug Screening”, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, vol. 82, n° 13, p. 1107–1112, jul. 1990, doi: 10.1093/jnci/82.13.1107.
- [151] N. Salahuddin, A. Akelah, M. Elnagar, e M. A. Abdelwahab, “Antibacterial and cytotoxicity of methylene blue loaded-cellulose nanocarrier on breast cancer cell line”, *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, vol. 2, p. 100138, dez. 2021, doi: 10.1016/j.carpta.2021.100138.
- [152] S. Al-Omari, “Toward a molecular understanding of the photosensitizer–copper interaction for tumor destruction”, *Biophys Rev*, vol. 5, n° 4, p. 305–311, dez. 2013, doi: 10.1007/s12551-013-0112-4.
- [153] L. P. Roguin, N. Chiarante, M. C. García Vior, e J. Marino, “Zinc(II) phthalocyanines as photosensitizers for antitumor photodynamic therapy”, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, vol. 114, p. 105575, set. 2019, doi: 10.1016/j.biocel.2019.105575.
- [154] M. Gabriela Lagorio, L. E. Dicelio, e E. San Román, “Visible and near-IR spectroscopic and photochemical characterization of substituted metallophthalocyanines”, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, vol. 72, n° 2, p. 153–161, maio 1993, doi: 10.1016/1010-6030(93)85022-Z.
- [155] D. K. Muli, P. Rajaputra, Y. You, e D. V. McGrath, “Asymmetric ZnPc–TEG photosensitizers: the effect of Pc substitution on phototoxicity”, *Tetrahedron Letters*, vol. 56, n° 45, p. 6236–6239, nov. 2015, doi: 10.1016/j.tetlet.2015.09.101.
- [156] M. Hanack, G. Schmid, e M. Sommerauer, “Chromatographic Separation of the Four Possible Structural Isomers of a Tetrasubstituted Phthalocyanine: Tetrakis(2-ethylhexyloxy)phthalocyaninatonickel(II)”, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, vol. 32, n° 10, p. 1422–1424, out. 1993, doi: 10.1002/anie.199314221.

- [157] A. A. Chernonosov, E. A. Ermilov, B. Röder, L. I. Solovyova, e O. S. Fedorova, “Effect of Some Substituents Increasing the Solubility of Zn(II) and Al(III) Phthalocyanines on Their Photophysical Properties”, *Bioinorganic Chemistry and Applications*, vol. 2014, p. 1–7, 2014, doi: 10.1155/2014/952632.
- [158] E. Ricci-Júnior e J. M. Marchetti, “Zinc(II) phthalocyanine loaded PLGA nanoparticles for photodynamic therapy use”, *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 310, n° 1–2, p. 187–195, mar. 2006, doi: 10.1016/j.ijpharm.2005.10.048.
- [159] Z. Yang *et al.*, “Preparation of zinc phthalocyanine-loaded amphiphilic phosphonium chitosan nanomicelles for enhancement of photodynamic therapy efficacy”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 202, p. 111693, jun. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2021.111693.
- [160] T. D. De Souza *et al.*, “Evaluation of photodynamic activity, photostability and in vitro drug release of zinc phthalocyanine-loaded nanocapsules”, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 83, p. 88–98, fev. 2016, doi: 10.1016/j.ejps.2015.12.006.
- [161] P. E. Feuser *et al.*, “Co-encapsulation of sodium diethyldithiocarbamate (DETC) and zinc phthalocyanine (ZnPc) in liposomes promotes increases phototoxic activity against (MDA-MB 231) human breast cancer cells”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 197, p. 111434, jan. 2021, doi: 10.1016/j.colsurfb.2020.111434.
- [162] V. S. Meka, M. K. G. Sing, M. R. Pichika, S. R. Nali, V. R. M. Kolapalli, e P. Kesharwani, “A comprehensive review on polyelectrolyte complexes”, *Drug Discovery Today*, vol. 22, n° 11, p. 1697–1706, nov. 2017, doi: 10.1016/j.drudis.2017.06.008.
- [163] S. Lankalapalli e Kolapalli, “Polyelectrolyte Complexes: A Review of their Applicability in Drug Delivery Technology”, *Indian J Pharm Sci*, p. 481–487, 2009, doi: 10.4103/0250-474X.58165.
- [164] A. C. Jayasuriya, “Production of micro- and nanoscale chitosan particles for biomedical applications”, em *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*, Elsevier, 2017, p. 185–209. doi: 10.1016/B978-0-08-100230-8.00008-X.
- [165] A. F. Martins, A. G. B. Pereira, A. R. Fajardo, A. F. Rubira, e E. C. Muniz, “Characterization of polyelectrolytes complexes based on N,N,N-trimethyl chitosan/heparin prepared at different pH conditions”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 86, n° 3, p. 1266–1272, ago. 2011, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.06.024.
- [166] L. Zhao, S. Bashiri, I. Toth, e M. Skwarczynski, “Preparation of Trimethyl Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes for Peptide Subunit Vaccine Delivery”, em *Bacterial Vaccines. Methods in Molecular Biology.*, vol. 2414, New York: Humana, 2022.
- [167] L. A. Giusti, M. Medeiros, N. L. Ferreira, J. R. Mora, e H. D. Fiedler, “Polymers containing imidazole groups as nanoreactors for hydrolysis of esters: POLYMERS CONTAINING IMIDAZOLE GROUPS AS NANOREACTORS FOR HYDROLYSIS OF ESTERS”, *J. Phys. Org. Chem.*, vol. 27, n° 4, p. 297–302, abr. 2014, doi: 10.1002/poc.3263.
- [168] F. Salahpour Anarjan, “Active targeting drug delivery nanocarriers: Ligands”, *Nano-Structures & Nano-Objects*, vol. 19, p. 100370, jul. 2019, doi: 10.1016/j.nanoso.2019.100370.
- [169] S. Chen *et al.*, “Mechanism-Based Tumor-Targeting Drug Delivery System. Validation of Efficient Vitamin Receptor-Mediated Endocytosis and Drug Release”, *Bioconjugate Chem.*, vol. 21, n° 5, p. 979–987, maio 2010, doi: 10.1021/bc9005656.
- [170] V. Balan, V. Redinciuc, N. Tudorachi, e L. Verestiuc, “Biotinylated N-palmitoyl chitosan for design of drug loaded self-assembled nanocarriers”, *European Polymer Journal*, vol. 81, p. 284–294, ago. 2016, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2016.06.014.

- [171] M. Cheng, W. Zhu, Q. Li, D. Dai, e Y. Hou, “Anti-cancer efficacy of biotinylated chitosan nanoparticles in liver cancer”, *Anti-cancer efficacy of biotinylated chitosan nanoparticles in liver cancer*, 2017.
- [172] H. Guo, X. Yan, H. Tang, e X. Zhang, “Assessment of Exenatide loaded Biotinylated Trimethylated Chitosan/HP- 55 Nanoparticles”, *Current Drug Delivery*, vol. 19, n° 1, p. 32–40, 2022, doi: 10.2174/1567201818666210614100603.
- [173] V. Balan, G. Dodi, C. T. Mihai, A. M. Serban, e V. C. Ursachi, “Biotinylated chitosan macromolecule based nanosystems: A review from chemical design to biological targets”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 188, p. 82–93, out. 2021, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.07.197.
- [174] Ö. V. Rúnarsson, J. Holappa, S. Jónsdóttir, H. Steinsson, e M. Másson, “N-selective ‘one pot’ synthesis of highly N-substituted trimethyl chitosan (TMC)”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 74, n° 3, p. 740–744, nov. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.03.008.
- [175] P. V. A. Bueno *et al.*, “N,N-Dimethyl chitosan/heparin polyelectrolyte complex vehicle for efficient heparin delivery”, *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 75, p. 186–191, abr. 2015, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.030.
- [176] A. F. Martins, J. F. Piai, I. T. A. Schuquel, A. F. Rubira, e E. C. Muniz, “Polyelectrolyte complexes of chitosan/heparin and N,N,N-trimethyl chitosan/heparin obtained at different pH: I. Preparation, characterization, and controlled release of heparin”, *Colloid Polym Sci*, vol. 289, n° 10, p. 1133–1144, jul. 2011, doi: 10.1007/s00396-011-2437-5.
- [177] A. Jintapattanakit, S. Mao, T. Kissel, e V. B. Junyaprasert, “Physicochemical properties and biocompatibility of N-trimethyl chitosan: Effect of quaternization and dimethylation”, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 70, n° 2, p. 563–571, out. 2008, doi: 10.1016/j.ejpb.2008.06.002.
- [178] L. A. Giusti, “Ácido poli(acrílico) funcionalizado como nanoreator na degradação de ésteres”, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014.
- [179] L. D. C. Baldi, E. T. Iamazaki, e T. D. Z. Atvars, “Evaluation of the polarity of polyamide surfaces using the fluorescence emission of pyrene”, *Dyes and Pigments*, vol. 76, n° 3, p. 669–676, jan. 2008, doi: 10.1016/j.dyepig.2007.01.011.
- [180] Paulo Fernando Amaral Costa, “Design racional e modelagem mecânica de complexos supramoleculares bioinspirados: potencialidades multifuncionais via catálise nucleofílica, básica-geral e fotoquímica.”, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2020.
- [181] B. Urbano, P. Silva, A. F. Olea, I. Fuentes, e F. Martinez, “Self-Assembly of Triblock Copolymers in Aqueous Solution”, *J. Chil. Chem. Soc.*, vol. 53, n° 2, jun. 2008, doi: 10.4067/S0717-97072008000200013.
- [182] T. Nyokong e E. Antunes, “Photochemical and Photophysical Properties of Metallophthalocyanines”, em *Handbook of Porphyrin Science (Volume 7)*, vol. 10, em *Handbook of Porphyrin Science*, vol. 10. , World Scientific Publishing Company, 2010, p. 247–357. doi: 10.1142/9789814307246_0006.
- [183] Fengying Lu, Zhengjun Li, Yong Kang, Zhiguo Su, Rong Yu, e Songping Zhang, “Black Phosphorus Quantum Dots Encapsulated in Anionic Waterborne Polyurethane Nanoparticles for Enhancing Stability and Reactive Oxygen Species Generation for Cancer PDT/PTT Therapy”, *J. Mater. Chem. B*, vol. 6, n° 3, p. 393–400, 2018, doi: 10.1039/D0TB02101F.
- [184] C. Hadjura, “Spectroscopic studies of photobleaching and photoproduct formation of meta(tetrahydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) used in photodynamic therapy. The production of singlet oxygen by m-THPC”, 1998.

- [185] A. P. Gerola *et al.*, “Liposome and polymeric micelle-based delivery systems for chlorophylls: Photodamage effects on *Staphylococcus aureus*”, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 177, p. 487–495, maio 2019, doi: 10.1016/j.colsurfb.2019.02.032.
- [186] L. T. Ueno, C. C. Jayme, L. R. Silva, E. B. Pereira, S. M. D. Oliveira, e A. E. H. Machado, “Photophysics and spectroscopic properties of zinc phthalocyanine revisited using quantum chemistry”, *J. Braz. Chem. Soc.*, vol. 23, n° 12, p. 2237–2247, dez. 2012, doi: 10.1590/S0103-50532012001200013.
- [187] A. Lyubimtsev *et al.*, “Aggregation behavior and UV-vis spectra of tetra- and octaglycosylated zinc phthalocyanines”, *J. Porphyrins Phthalocyanines*, vol. 15, n° 01, p. 39–46, jan. 2011, doi: 10.1142/S1088424611002891.
- [188] I. R. Calori, C. C. Jayme, L. T. Ueno, F. B. C. Machado, e A. C. Tedesco, “Theoretical and experimental studies concerning monomer/aggregates equilibrium of zinc phthalocyanine for future photodynamic action”, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, vol. 214, p. 513–521, maio 2019, doi: 10.1016/j.saa.2019.02.086.
- [189] X. Ma *et al.*, “Fluorescence Aggregation-Caused Quenching versus Aggregation-Induced Emission: A Visual Teaching Technology for Undergraduate Chemistry Students”, *J. Chem. Educ.*, vol. 93, n° 2, p. 345–350, fev. 2016, doi: 10.1021/acs.jchemed.5b00483.
- [190] G. J. Smith, “THE EFFECTS OF AGGREGATION ON THE FLUORESCENCE and THE TRIPLET STATE YIELD OF HEMATOPORPHYRIN”, *Photochem & Photobiology*, vol. 41, n° 2, p. 123–126, fev. 1985, doi: 10.1111/j.1751-1097.1985.tb03459.x.
- [191] M. Kasha, H. R. Rawls, e M. Ashraf El-Bayoumi, “The exciton model in molecular spectroscopy”, *Pure and Applied Chemistry*, vol. 11, n° 3–4, p. 371–392, jan. 1965, doi: 10.1351/pac196511030371.
- [192] A. B. Sieval, M. Thanoual, A. F. Kotzkb, J. C. Verhoefa, J. BrusseeC, e H. E. Junginger, “Preparation and NMR characterization of highly substituted IV-trimethyl chitosan chloride”.
- [193] D. De Britto, L. A. Forato, e O. B. G. Assis, “Determination of the average degree of quaternization of N,N,N-trimethylchitosan by solid state ¹³C NMR”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 74, n° 1, p. 86–91, out. 2008, doi: 10.1016/j.carbpol.2008.01.021.
- [194] J. H. Hamman e A. F. Kotzé, “Effect of the Type of Base and Number of Reaction Steps on the Degree of Quaternization and Molecular Weight of N -Trimethyl Chitosan Chloride”, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, vol. 27, n° 5, p. 373–380, jan. 2001, doi: 10.1081/DDC-100104312.
- [195] T. Xu, M. Xin, M. Li, H. Huang, e S. Zhou, “Synthesis, characteristic and antibacterial activity of N,N,N-trimethyl chitosan and its carboxymethyl derivatives”, *Carbohydrate Polymers*, vol. 81, n° 4, p. 931–936, jul. 2010, doi: 10.1016/j.carbpol.2010.04.008.
- [196] T. Xu, M. Xin, M. Li, H. Huang, S. Zhou, e J. Liu, “Synthesis, characterization, and antibacterial activity of N,O-quaternary ammonium chitosan”, *Carbohydrate Research*, vol. 346, n° 15, p. 2445–2450, nov. 2011, doi: 10.1016/j.carres.2011.08.002.
- [197] M. Mohammed, J. Syeda, K. Wasan, e E. Wasan, “An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery”, *Pharmaceutics*, vol. 9, n° 4, p. 53, nov. 2017, doi: 10.3390/pharmaceutics9040053.
- [198] R. Gref, P. Couvreur, G. Barratt, e E. Mysiakine, “Surface-engineered nanoparticles for multiple ligand coupling”, *Biomaterials*, vol. 24, n° 24, p. 4529–4537, nov. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00348-X.
- [199] P. Y. Bruice, “Mass Spectrometry and Infrared Spectroscopy”, em *Organic Chemistry*, 4° ed, New Jersey: Prentice Hall, 2003, p. 1228.

- [200] M. Chaabene, B. Gassoumi, P. Mignon, R. Ben Chaâbane, e A.-R. Allouche, “New zinc phthalocyanine derivatives for nitrogen dioxide sensors: A theoretical optoelectronic investigation”, *Journal of Molecular Graphics and Modelling*, vol. 88, p. 174–182, maio 2019, doi: 10.1016/j.jmgm.2019.01.008.
- [201] R. Brahma e J. B. Baruah, “Self-Assemblies of Zinc Complexes for Aggregation-Induced Emission Luminogen Precursors”, *ACS Omega*, vol. 5, n° 7, p. 3774–3785, fev. 2020, doi: 10.1021/acsomega.0c00136.
- [202] A. D. Martins, “Polimerização por abertura de anel de monômeros cíclicos por catalisadores à base de zinco”, Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2020. [Online]. Disponível em: <https://lume.ufrgs.br/bitstream/handle/10183/220407/001123996.pdf>
- [203] X. Lin *et al.*, “Characterization of Imidazole Compounds in Aqueous Secondary Organic Aerosol Generated from Evaporation of Droplets Containing Pyruvaldehyde and Inorganic Ammonium”, *Atmosphere*, vol. 13, n° 6, p. 970, jun. 2022, doi: 10.3390/atmos13060970.
- [204] V. Thamilarasan *et al.*, “Single Step Fabrication of Chitosan Nanocrystals Using *Penaeus semisulcatus*: Potential as New Insecticides, Antimicrobials and Plant Growth Promoters”, *J Clust Sci*, vol. 29, n° 2, p. 375–384, mar. 2018, doi: 10.1007/s10876-018-1342-1.
- [205] D. E. Moore, *The Photostability of Drugs and Drug Formulations: Photophysical photochemical and aspects of drug stability*. London: Taylor & Francis Ltd, 2003.
- [206] A. Iagatti *et al.*, “Photophysical Processes Occurring in a Zn-phthalocyanine in Ethanol Solution and on TiO Nanostructures”, *J. Phys. Chem. C*, vol. 119, n° 35, p. 20256–20264, set. 2015, doi: 10.1021/acs.jpcc.5b04978.
- [207] G. Valduga, E. Reddi, G. Jori, R. Cubeddu, P. Taroni, e G. Valentini, “Steady state and time-resolved spectroscopic studies on zinc(II) phthalocyanine in liposomes”, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 16, n° 3–4, p. 331–340, dez. 1992, doi: 10.1016/1011-1344(92)80020-V.
- [208] E. Bernal *et al.*, “Fluorescence quenching of 1-pyrene-carboxaldehyde by iodide ions in the presence of anionic (SDS) and cationic (CTAC) micelles: a quantitative treatment”, *RSC Adv.*, vol. 5, n° 58, p. 46485–46492, 2015, doi: 10.1039/C5RA03412D.
- [209] M. K. Kuimova *et al.*, “Photophysical properties and intracellular imaging of water-soluble porphyrin dimers for two-photon excited photodynamic therapy”, *Org. Biomol. Chem.*, vol. 7, n° 5, p. 889, 2009, doi: 10.1039/b814791d.
- [210] B. Jana *et al.*, “Self-Assembly of Mitochondria-Targeted Photosensitizer to Increase Photostability and Photodynamic Therapeutic Efficacy in Hypoxia”, *Chemistry A European J*, vol. 26, n° 47, p. 10695–10701, ago. 2020, doi: 10.1002/chem.202001366.

**APÊNDICE A – DADOS EXPERIMENTAIS DE VISCOSIDADE DA
QUITOSANA**

Tabela A 1 – Dados experimentais obtidos no experimento de viscosidade intrínseca da quitosana em uma solução aquosa contendo ácido acético 0,3 mol L⁻¹ e acetato de sódio 0,2 mol L⁻¹.

Concentração de Quitosana	Densidade	η	η_{rel}	η_{esp}	η_{red}
g mL⁻¹	g mL⁻¹	mPa s⁻¹	-	-	mL g⁻¹
0	1,00342	1,0919	1	0	-
1,0×10 ⁻⁴	1,00342	1,1561	1,05880	0,05880	587,96
2,0×10 ⁻⁴	1,00342	1,2353	1,13133	0,13133	656,65
3,0×10 ⁻⁴	1,00348	1,3321	1,21998	0,21998	733,27
4,0×10 ⁻⁴	1,00349	1,4309	1,31047	0,31047	776,17
5,0×10 ⁻⁴	1,00357	1,5500	1,41954	0,41954	839,09

APÊNDICE B – ESPECTRO DE INFRAVERMELHO DA QUITOSANA

Figura B 1 – Espectro de infravermelho da quitosana ($400\text{-}4000\text{ cm}^{-1}$) empregado na caracterização e no cálculo do $\text{GD}_{\text{FT-IR}}$. As bandas destacadas em 3300 e 1420 cm^{-1} são representativas dos monômeros desacetilados da quitosana, ao passo que a banda em 1320 cm^{-1} representa o monômero acetilado.

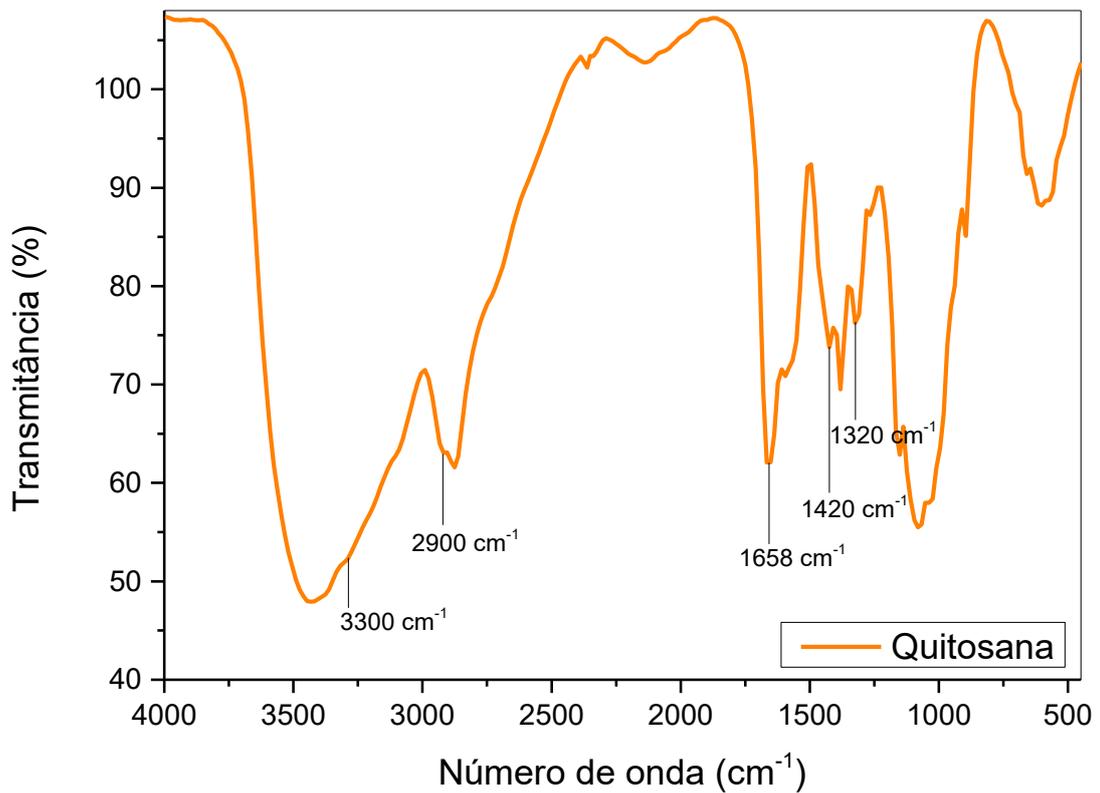


Figura B 2 – Destaque do infravermelho da quitosana plotado em absorbância, na região de interesse dos picos em 1324 cm^{-1} e 1424 cm^{-1} e suas respectivas áreas, utilizadas para calcular o GD_{FT-IR} pela Equação 7.

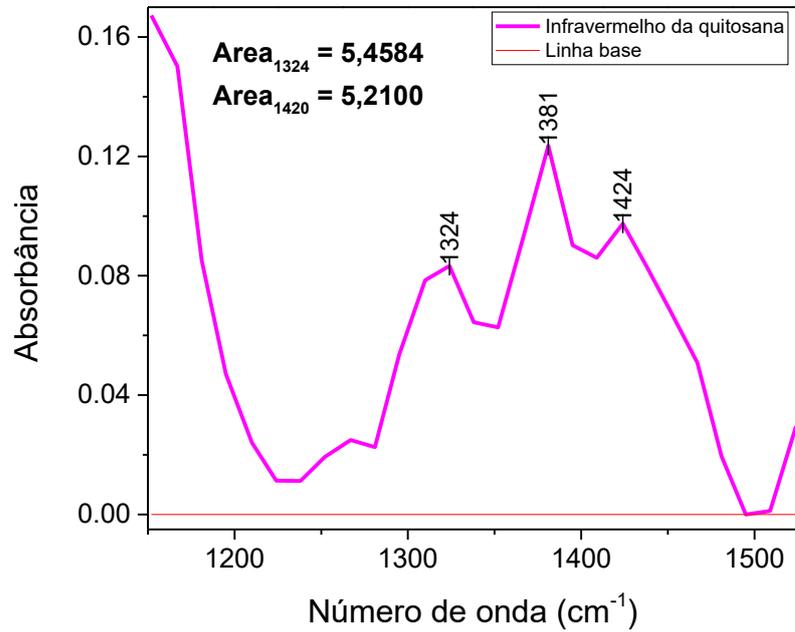
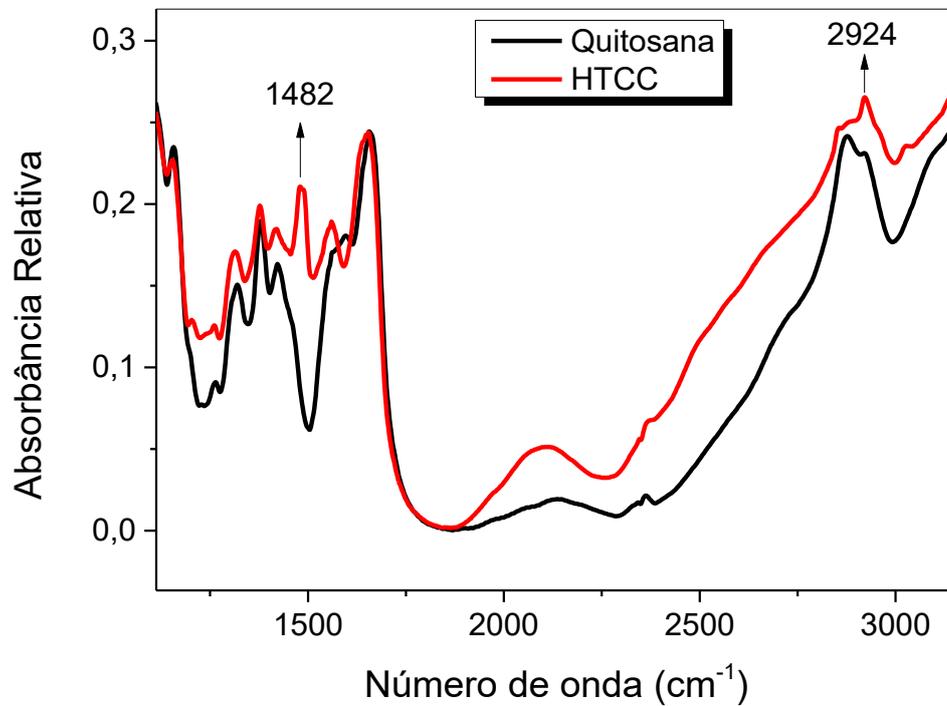
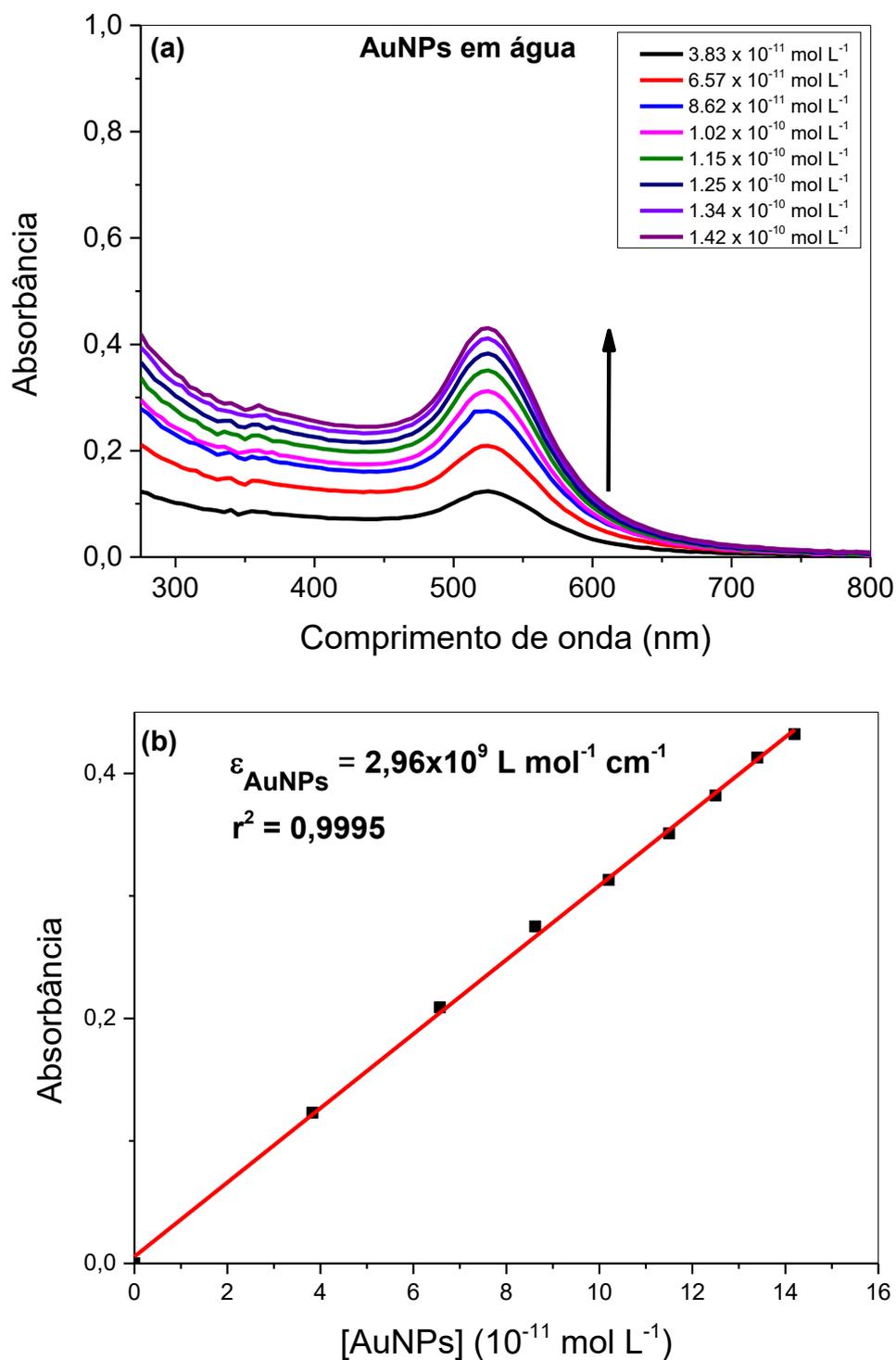


Figura B 3. Espectros de absorção infravermelho da quitosana e da TMC, em ampliação.

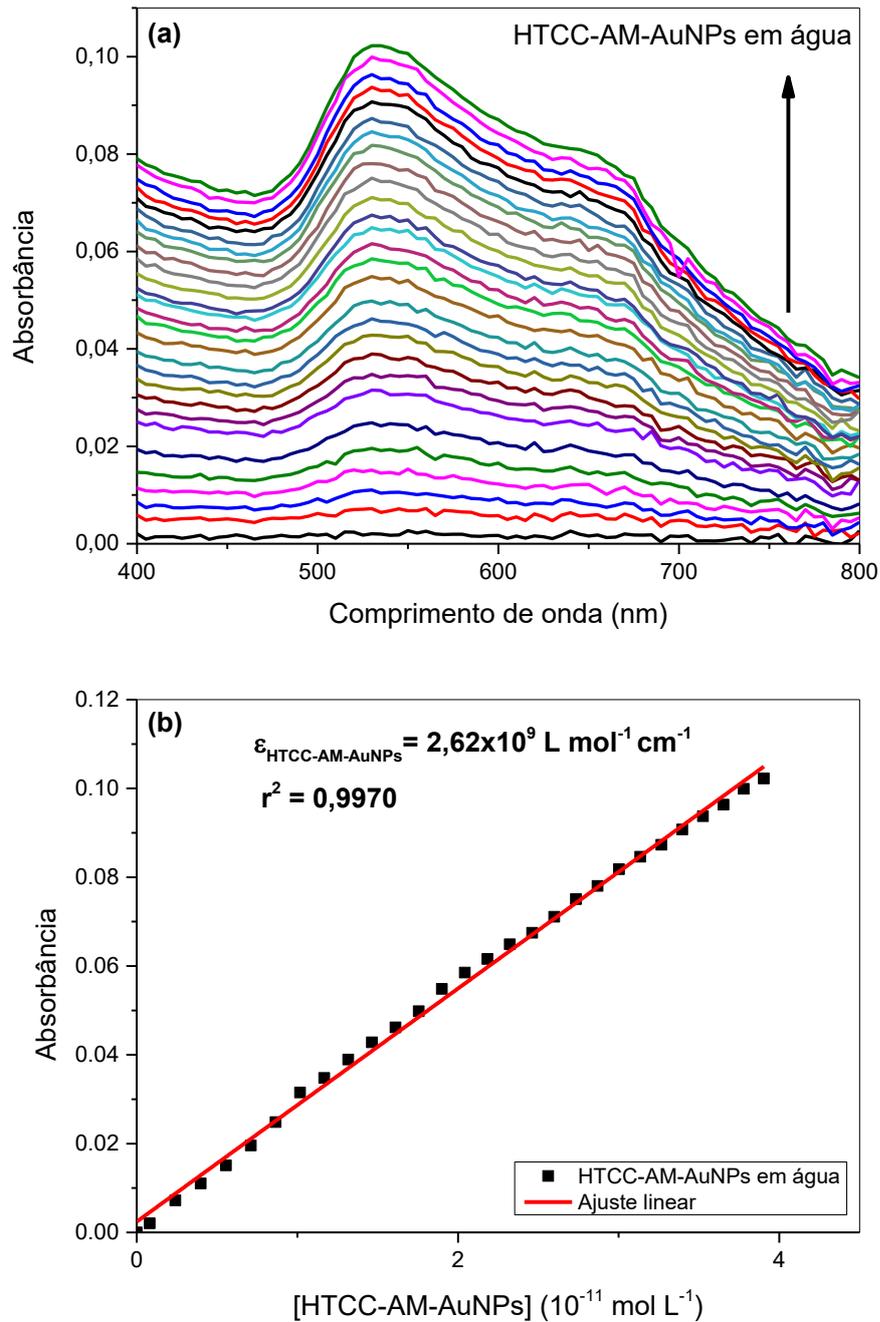


APÊNDICE C – COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR DAS AUNPS

Figura C 1 – (a) Espectros de absorção de UV-Vis e (b) Curva de calibração para determinação de ϵ de AuNPs em água, 25 °C.

APÊNDICE D – COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR DO CONJUGADO HTCC-AM-AUNPS

Figura D 1 – (a) Espectros de absorção de UV-Vis do HTCC-AM-AuNPs em água, as concentrações do conjugado variam de 0 a $3,9 \times 10^{-11} \text{ mol L}^{-1}$. (b) Regressão linear para determinação do $\epsilon_{\text{HTCC-AM-AuNPs}}$, em água, 25 °C.



APÊNDICE E – COEFICIENTE DE ABSORÇÃO MOLAR DA ZNPC EM ETANOL E EM ÁGUA

Figura E 1 – (a) Espectros de absorção de UV-Vis da ZnPc em etanol, em diferentes concentrações (0 a $4,53 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). Os comprimentos de onda de máxima absorção de luz, bem como as bancas às quais correspondem estão destacados. (b) Regressão linear para a determinação do $\epsilon_{\text{ZnPc,etanol}}$ em 664 nm. (c) Regressão linear para a determinação do $\epsilon_{\text{ZnPc,etanol}}$ em 605 nm.

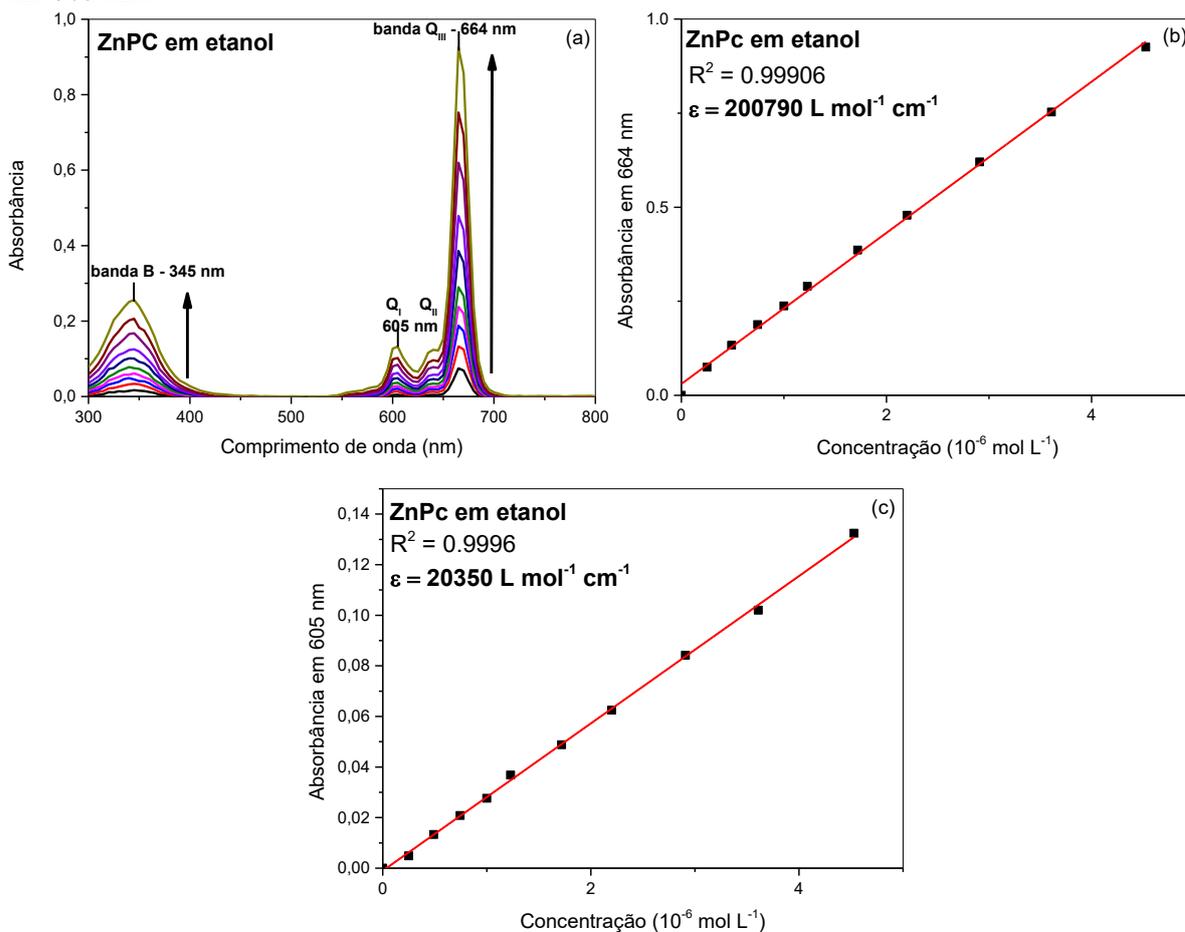
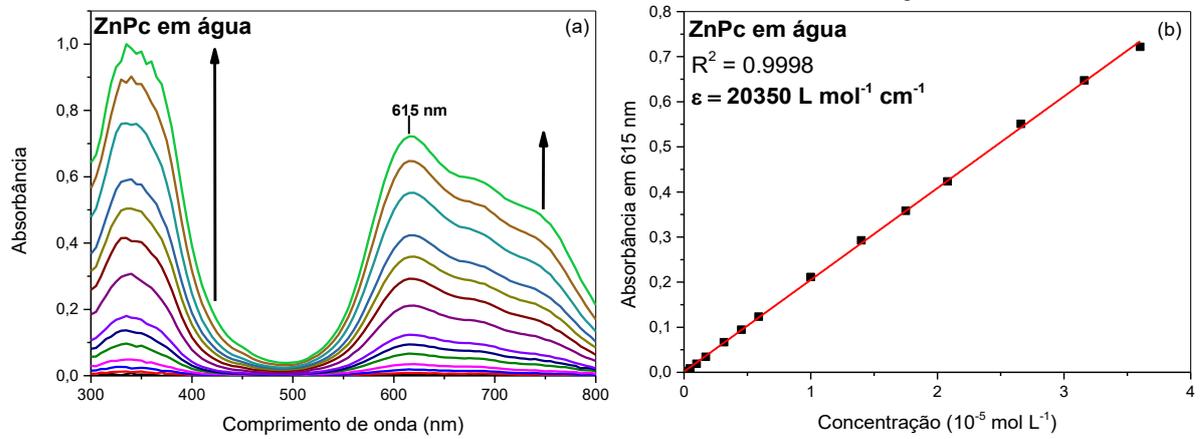
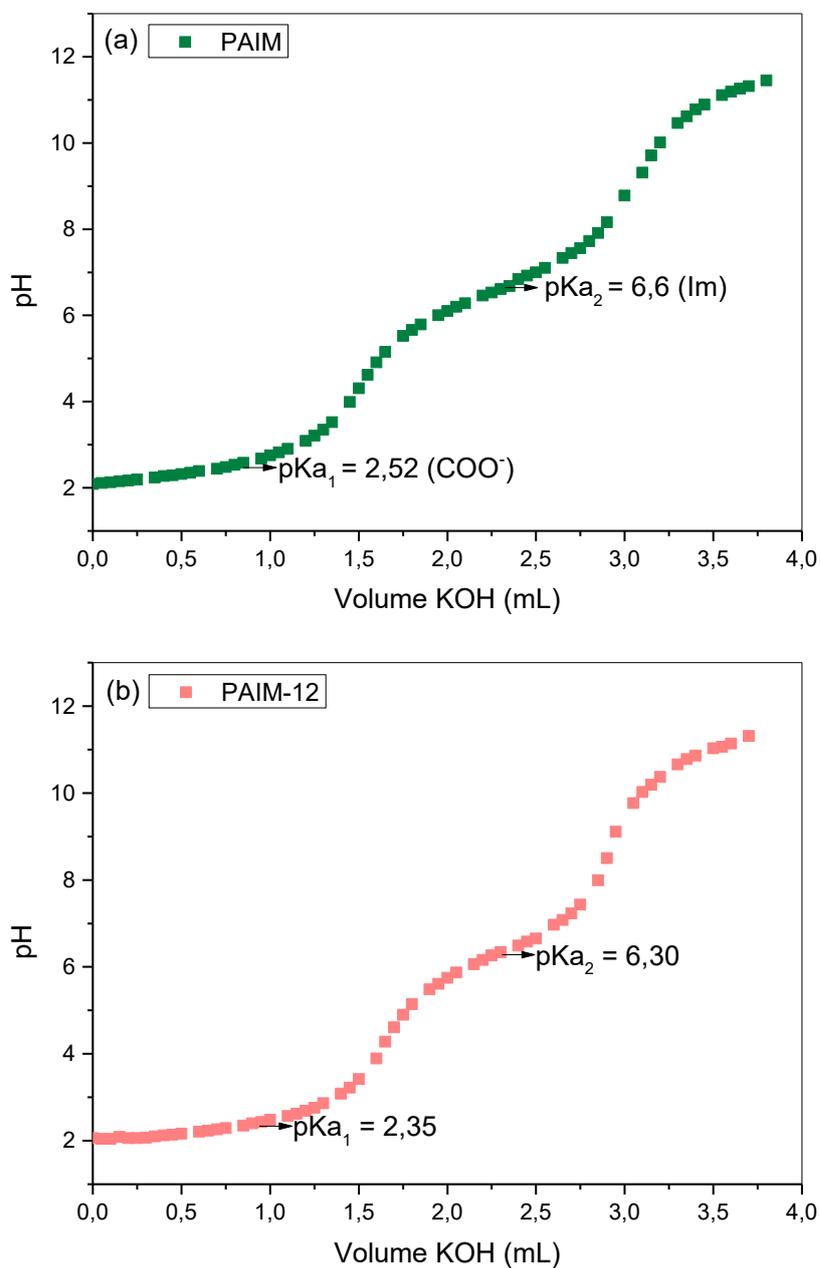


Figura E 2 – (a) Espectros de absorção de UV-Vis da ZnPc em água, em diferentes concentrações (0 a $3,60 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$). O comprimento de onda de máxima absorção de luz ocorre em 615 nm . (b) Regressão linear para a determinação do $\epsilon_{\text{ZnPc, água}}$ em 615 nm .



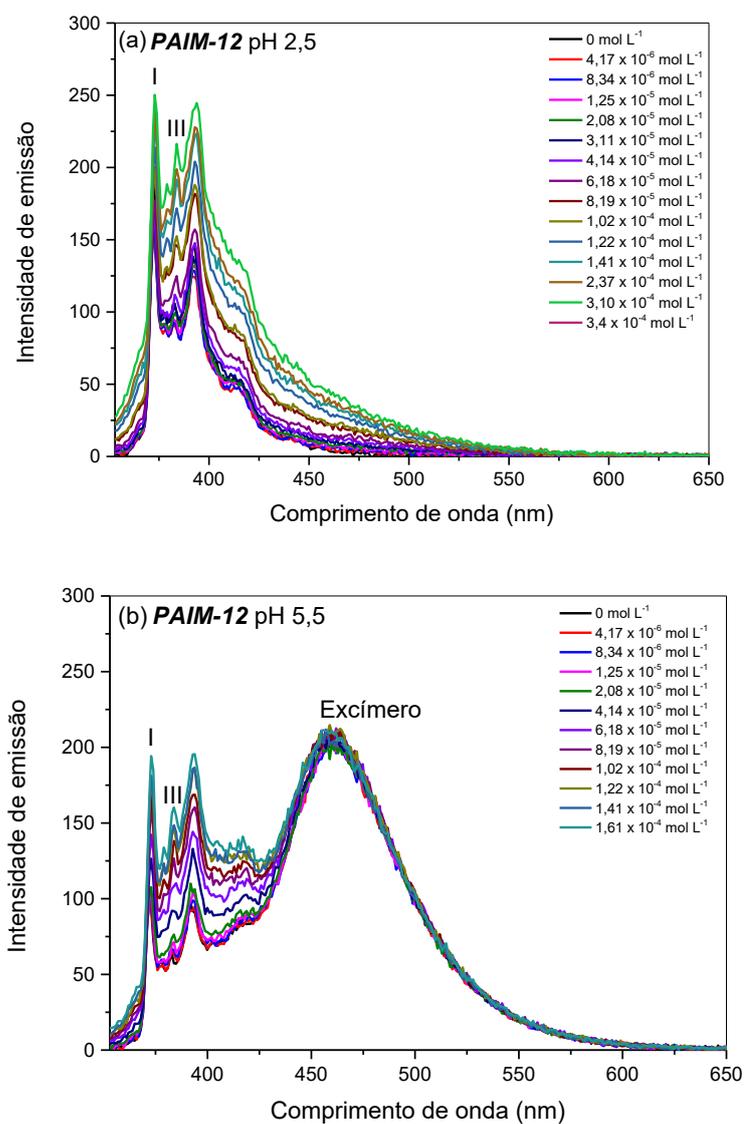
APÊNDICE F – CURVAS DE TITULAÇÃO POTENCIOMÉTRICA PARA PAIM E PAIM-12

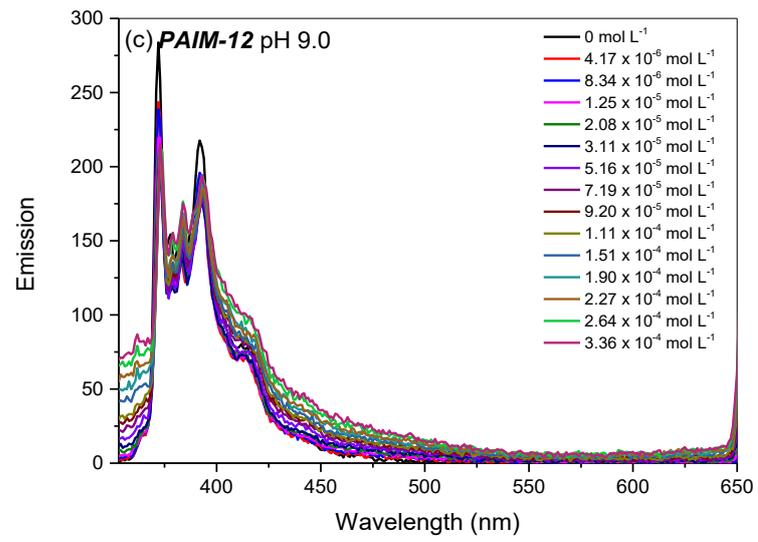
Figura F 1 – Curvas de titulação potenciométrica para o PAIm (a) e para o PAIm-12 (b). O número de mols de polímero titulado foi de 1×10^{-4} mol, equivalente a 28 mg para o PAIm e 45 mg para o PAIm-12. Solução titulante empregada - KOH $0,085 \text{ mol L}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$.



APÊNDICE G - PERFIS DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA DO PIRENO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE PAIM-12

Figura G 1 – Perfis de emissão de fluorescência de pireno em titulação com PAIm-12 em (a) pH 2,5; (b) pH 5,5 (Tampão Bis-Tris 0,1 mol L⁻¹) e (c) pH 9,0 (Tampão Tris 0,1 mol L⁻¹). [pireno] = 5×10⁻⁷ mol L⁻¹.





**ANEXO A – CARACTERÍSTICAS DA FONTE DE EMISSÃO DE LUZ
BRANCA “QUENTE” – SISTEMA LED *IN VITRO* K1490_M006**

Figura AA 1 – (a) Irradiância espectral do sistema de LED *in vitro*, modelo K1490_M006, luz branca. (b) Curva de calibração de irradiância *versus* porcentagem de PWM.

