

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PROCESSAMENTO DE MATERIAIS

ELIANE DE FÁTIMA SOUZA

**FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE VATERITA
COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
PARA COMPOSTOS BIOATIVOS**

São José dos Campos, SP
2020

ELIANE DE FÁTIMA SOUZA

**FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE VATERITA
COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA
PARA COMPOSTOS BIOATIVOS**

Dissertação de Mestrado Profissional apresentada no Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos para obtenção do título de Mestre em Processamento de Materiais.

Orientadora: Profa. Dr^a. Andreza Ribeiro Simioni
Coorientadora: Profa. Dr^a Erika Peterson Gonçalves

São José dos Campos, SP
2020

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Souza, Eliane de Fátima
FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE VATERITA
COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA PARA COMPOSTOS BIOATIVOS /
Eliane de Fátima Souza, orientadora, Andreza Ribeiro Simioni, co-
orientadora Erika Peterson Gonçalves. - São José dos Campos, SP,
2020.

72 p.

Dissertação (Mestrado Profissional) - Universidade do Vale do
Paraíba, São José dos Campos, Programa de Pós-Graduação em
Processamento de Materiais.

Inclui referências

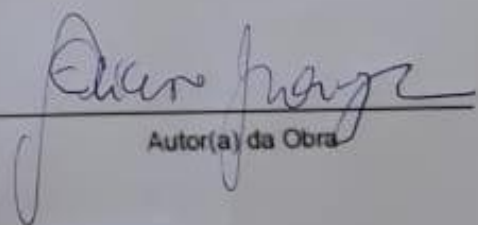
1. Processamento de Materiais. I. Processamento de Materiais.
2. Micropartículas Carbonato de Cálcio. 4. Terapia Fotodinâmica.
5. Ftalocianina Cloro Alumínio. I. Simioni, Andreza Ribeiro,
orient. II. Gonçalves, Erika Peterson, co-orient. III.
Universidade do Vale do Paraíba, Programa de Pós-Graduação em
Processamento de Materiais. IV. Título.

Eu, Eliane de Fátima Souza, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em
outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o
usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado
respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de
propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e
profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 1 de Junho de 2020.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 09 / 06 / 2020

ELIANE DE FÁTIMA SOUZA

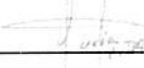
“FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE VATERITA COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA PARA COMPOSTOS BIOATIVOS”.

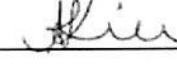
Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Processamento de Materiais, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

PROF.^ª DR.^ª VALDIRENE APARECIDA DA SILVA 

PROF.^ª DR.^ª ANDREZA RIBEIRO SIMIONI 

PROF.^ª DR.^ª ERIKA PETERSON GONÇALVES 

PROF.^ª DR.^ª LÚCIA VIEIRA 

PROF.^ª DR.^ª ANDREA SANTOS LIU – IFSP 



Prof.^ª Dr.^ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 09 de junho de 2020.

ESTE TRABALHO É DEDICADO:

Este trabalho é dedicado a Deus acima de todas as coisas.

À minha mãe, Isaura e ao meu irmão José Ailson, pelo apoio em todos os momentos para que esta vitória fosse possível.

À minha tia Elza que foi a minha maior incentivadora a começar este mestrado, que entendeu os meus momentos de stress, por ter paciência e ter me ajudado, auxiliado e seus valiosos conselhos.

Aos meus amigos, pelo apoio e convivência nessa trajetória.

Aos professores e a todos que direta e indiretamente se tornaram corresponsáveis desta conquista.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me conceder a dádiva da vida e por me apoiar em todo o meu caminho. Agradeço por ter me iluminado a fazer sempre o certo e por ter me dado a oportunidade de viver tudo isso e não somente nestes anos no mestrado, mas que em todos os momentos.

Agradeço em especial a minha mãe, Isaura minha melhor amiga, que me deu apoio, incentivo nas horas difíceis, que não me deixou desistir na minha primeira dificuldade, que entendeu todos os meus momentos de estresse, que ficou do meu lado sempre, agradeço simplesmente por ser minha mãezinha querida, que me ensinou a ser o que eu sou hoje, me apoiando incondicionalmente.

À Prof. Dr^a. Andreza Ribeiro Simioni, por me dar a oportunidade de aprender e de adquirir conhecimento em diversas metodologias até então desconhecidas. Obrigado por confiar em minha capacidade para desenvolver este trabalho e também por vibrar diante de cada resultado, e assim motivar o desenvolvimento deste. Obrigado pelo incentivo, confiança, paciência, compreensão e confiança, paciência e especialmente pela amizade. Tenho profunda admiração por você!

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Erika Peterson Gonçalves, pela disposição, aprendizado e orientação em me auxiliar no desenvolvimento desta dissertação. Pela orientação em mais essa etapa de minha vida acadêmica do trabalho. Obrigado pela oportunidade, confiança, paciência e por ter paciência e ter me ajudado em tudo que eu precisei especialmente pela amizade.

A uma querida amiga que me orientou e passou uma energia muito forte, a Prof^a Dr^a Valdirene Aparecida desenvolvimento desta dissertação. Que sempre se colocou de maneira carinhosa e profissional nos momentos difíceis.

Agradeço aos colegas do laboratório de Síntese Orgânica IP&D, Jéssica, Bruna, Daniele que colaboraram com o meu aprendizado e desenvolvimento pessoal e profissional.

A Universidade do Vale do Paraíba e a FAPESP pela bolsa de fomento, sendo a qual foi possível iniciar e concluir esse projeto.

FABRICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE VATERITA COMO SISTEMAS DE LIBERAÇÃO CONTROLADA PARA COMPOSTOS BIOATIVOS

RESUMO

O carbonato de cálcio (CaCO_3) é um dos materiais mais abundantes do mundo. Possui várias fases cristalinas diferentes como presentes nos minerais: calcita, aragonita e vaterita, os quais são polimorfos cristalinos anidros. Em relação à preparação dessas micropartículas, o aspecto mais importante é o controle do polimorfismo, tamanho de partícula e morfologia do material. Este estudo visou desenvolver micropartículas porosas de carbonato de cálcio na fase de vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$) para o encapsulamento da ftalocianina de cloro-alumínio (CIAIPc) como fotossensibilizador (FS) para aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD). As micropartículas foram produzidas pela precipitação química a partir de soluções de carbonato de sódio e cloreto de cálcio na presença do surfactante aniônico poli (4-estirenosulfonato de sódio) (PSS) como estabilizante. Foram controlados os parâmetros na síntese das micropartículas, como supersaturação das soluções, agitação e tempo de reação, buscando as condições ideais para a obtenção das micropartículas esféricas na fase de vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$). O progresso da reação foi acompanhado por microscopia eletrônica de varredura para avaliar a produção de $\mu\text{-CaCO}_3$. As micropartículas encapsuladas com o fotossensibilizador ($\mu\text{-CaCO}_3/\text{CIAIPc}$) apresentaram forte banda de absorção na região do vermelho com máximo de absorção localizado em 674 nm, mostrando perfil característico de uma espécie não agregada na faixa de concentração estudada. A Difração de raios X, mostrou as fases obtidas no processo de síntese das micropartículas e a porosidade aparente determinada por BET com tamanho médio de, aproximadamente, 37 nm. Foi demonstrado pela internacionalização celular, utilizando macrófagos como modelo biológico, que as partículas capturadas fornecem a localização do corante dentro da célula aumentando sua concentração local. Conforme determinado por um ensaio de viabilidade, foi possível observar redução significativa da viabilidade, nos grupos tratados com a maior concentração, de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, alcançando aproximadamente 50% de redução no grupo tratado com 10 J/cm^2 . Os resultados nos permitiram concluir que o CIAIPc carregado em $\mu\text{-CaCO}_3$ pode ter aplicação potencial como sistema de liberação de fármacos para protocolos de TFD.

Palavras-chave: Carbonato de Cálcio, Ftalocianinas, Micropartículas, Vaterita.

Manufacture and characterization of vaterite microparticles as controlled release systems for bioactive compounds

ABSTRACT

Calcium carbonate (CaCO_3) is one of the most abundant materials in the world. It has several different crystalline phases as present in the minerals: calcite, aragonite and vaterite, which are anhydrous crystalline polymorphs. Regarding the preparation of these microparticles, the most important aspect is the control of the polymorphism, particle size and material morphology.

This study aimed to develop porous microparticles of calcium carbonate in the vaterite phase ($\mu\text{-CaCO}_3$) for the encapsulation of chloro-aluminum phthalocyanine (ClAlPc) as a photosensitizer (FS) for application in Photodynamic Therapy (TFD). The microparticles were produced by chemical precipitation from solutions of sodium carbonate and calcium chloride in the presence of anionic surfactant poly (sodium 4-styrenesulfonate) (PSS) as a stabilizer. The parameters in the synthesis of the microparticles were controlled, such as supersaturation of the solutions, agitation and reaction time, seeking the ideal conditions for obtaining the spherical microparticles in the vaterite phase ($\mu\text{-CaCO}_3$). The progress of the reaction was monitored by scanning electron microscopy to assess the production of $\mu\text{-CaCO}_3$. The microparticles encapsulated with the photosensitizer ($\mu\text{-CaCO}_3$ / ClAlPc) showed a strong absorption band in the red region with maximum absorption located at 674 nm, showing a characteristic profile of a non-aggregated species in the studied concentration range. X-ray diffraction showed the phases obtained in the microparticle synthesis process and the apparent porosity determined by BET with an average size of approximately 37 nm. It was demonstrated by cellular internalization, using macrophages as a biological model, that the captured particles provide the location of the dye within the cell, increasing its local concentration. As determined by a viability test, it was possible to observe a significant reduction in viability, in the groups treated with the highest concentration, of $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, reaching approximately 50% reduction in the group treated with 10 J / cm^2 . The results allowed us to conclude that ClAlPc loaded in $\mu\text{-CaCO}_3$ may have potential application as a drug delivery system for PDT protocols.

KEYWORDS: Calcium carbonate, Phthalocyanines, Microparticles, Vaterite.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Esquema geral da TFD.....	14
Figura 2: Protocolo de aplicação da Terapia Fotodinâmica.....	19
Figura 3: Diagrama de Jablonski ilustrando as reações fotoquímicas a partir da excitação de fotossensibilizadores.....	21
Figura 4: Estrutura química do Photofrin® classificado como fotossensibilizador de 1ª geração.....	23
Figura 5: Núcleos básicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na TFD.....	24
Figura 6: Estrutura molecular das ftalocianinas base livre e metaladas.....	25
Figura 7: Estrutura química do cloro alumínio ftalocianina (ClAlPc).....	26
Figura 8: Concentração do fármaco: liberação controlada (A) e terapia convencional (B).....	29
Figura 9: Polimorfismo do carbonato de cálcio (CaCO ₃).....	34
Figura 10: Fluxograma do desenvolvimento do projeto de pesquisa.....	37
Figura 11: Representação esquemática da precipitação química para preparação de micropartículas de CaCO ₃	38
Figura 12: Células unitárias das fases polimórficas do CaCO ₃ . a) calcita, b) vaterita, c) aragonita.....	44
Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de CaCO ₃ na ausência de PSS e agitação de 1500 rpm.....	45
Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de CaCO ₃ na presença de PSS e agitação vigorosa com ultraturrax: a) 5 min; b) 11 min, c) 15 min, d) 20 min após a mistura dos reagentes.....	47
Figura 15: Detalhe da morfologia da superfície da micropartícula porosa de CaCO ₃	48
Figura 16: Espectro de absorção no Uv-vis da ClAlPc livre (etanol) e encapsulada em μ -CaCO ₃	49
Figura 17: (a): Espectros de absorção de ClAlPc em diferentes concentrações; (b): gráfico da concentração de ClAlPc vs. Absorbância.....	50
Figura 18: Esquema em escala da Célula Unitária Vaterita. Esferas vermelhas: Oxigênio, esferas verdes: cálcio e esferas cinza: carbono.....	51
Figura 19: Difratoograma de Raios X das micropartículas de carbonato de cálcio sintetizadas por precipitação química.....	52
Figura 20: Difratoograma de Raios X da Cloro Alumínio Ftalocianina.....	53
Figura 21: Difratoograma de Raios X das micropartículas de vaterita encapsuladas com Cloro Alumínio Ftalocianina.....	54
Figura 22: Distribuição de tamanho de Poros das micropartículas de vaterita.....	56
Figura 23: Espectros de FTIR das micropartículas de CaCO ₃	57
Figura 25: Viabilidade do teste do Azul de Tripán. Em A observamos macrófagos do grupo controle, com membrana intacta, e, portanto, sem coloração. Em B observamos um grupo após tratamento com TFD com 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, onde é observado algumas células sem corante (células vivas), e algumas coradas (células mortas).....	59
Figura 26: Viabilidade celular dos macrófagos avaliada pelo teste de azul de tripan. Os grupos denominados Escuro compreendem amostras mantidas ao abrigo de luz. Os grupos que receberam apenas LED ou TFD estão identificados pela fluência utilizada, de 5 J.cm ⁻² e 10 J.cm ⁻² . (* $\leq 0,01$) (● $\leq 0,01$).....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Caracterização do tamanho dos poros das micropartículas de vaterita.....	54
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BET	Brunauer – Emmett– Teller
CCA	Carbonato de Cálcio Amorfo
CPNM	Cancer de pele não - melanoma
CIAIPc	Cloro alumínio ftalocianina
DRX	Difração de Raios X
DMSO	Dimetilsulfóxido
DDS	Sistema de Liberação Controlada
DMEM	Dulbecco modification of Minimum Essential Media
EPR	Efeito de permeabilidade e retenção aumentada
EROs	Espécies reativas de oxigênio
%EE	Eficiência de Encapsulamento
FS	Fotossensibilizador
Hp	Hematoporfirina
HpD	Derivado de hematoporfirina
LED	Diodo emissor de luz
MEV	Micróscpio Eletrônico de Varredura
NPG	Nanopartículas de gelatina
Nm	nanômetro
$^1\text{O}_2$	Oxigênio no estado singlete
$^3\text{O}_2$	Oxigênio no estado triplete
PSS	Poli 4-estirenosulfonato de sódio
Rpm	Rotação por minuto
S_0	Estado singlete fundamental
S_n	Estado singlete excitado
SUS	Sistema Único de Saúde
TFD	Terapia Fotodinâmica
$\mu\text{-CaCO}_3$	Micropartículas Carbonato de Cálcio

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
1.1	Objetivo Geral.....	15
1.2	Objetivos Específicos.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1	Terapia Fotodinâmica	17
2.1.1	Mecanismo da ação na Terapia Fotodinâmica	20
2.1.2	Fotossensibilizadores	21
2.1.3	Ftalocianinas	24
2.1.4	Cloro Ftalocianina de Alumínio (CIAIPc)	27
2.2	Sistemas de liberação controlada de fármacos	28
2.3	Materiais Porosos	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS	35
3.1	Materiais.....	36
3.2	Métodos	36
3.2.1	Produção das (μ -CaCO ₃).....	37
3.2.2	Caracterização morfológica μ -CaCO ₃	38
3.2.3	Caracterização por Espectroscopia no Uv-Visível (Uv-vis)	39
3.2.4	Caracterização de Fases – Difratomia de Raios X (DRX).....	39
3.2.5	Caracterização de Tamanhos dos Poros - Brunauer – Emmett– Teller (BET)	40
3.2.6	Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho.....	40
3.2.7	Determinação da Eficiência de encapsulamento (EE).....	40
3.2.8	Cultura da cepa de RAW 264.7	41
3.2.9	Estudos de citotoxicidade e fototoxicidade	41
3.2.10	Internalização da Ftalocianina	41
3.2.11	Avaliação da viabilidade celular.....	40
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
4.1	Caracterização Morfológica das μ -CaCO ₃	41
4.2	Estudo das propriedades fotofísicas no estado estacionário.....	48
4.3.	Difratomia de Raios X (DRX).....	51
4.4	Caracterização de Tamanhos dos Poros - Brunauer – Emmett– Teller (BET)	53
4.5	Espectroscopia no Infravermelho (IV)	56
4.6	Internalização da Ftalocianina	57
4.7	Avaliação da viabilidade celular	59
5	CONCLUSÕES	60
	REFERÊNCIAS	61
	ANEXOS.....	74

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, uma variedade de terapias tem emergido como consequência de avanços no campo das ciências e das tecnologias aplicadas a sistemas biológicos, mais precisamente a área inovadora que envolve uma ciência multidisciplinar conhecida como nanobiotecnologia, referindo-se às tecnologias em que a matéria é manipulada às escalas atômica e molecular para criar novos materiais com características funcionais diferentes dos materiais comuns, visando à aplicação prática desse conhecimento nas áreas da saúde (FARIA-TISCHER; TISCHER, 2012). A terapia fotodinâmica (TFD) e o emprego de sistemas micro e nanoestruturados como veículos para a liberação dos fotossensibilizadores (FS) é uma área promissora e encontra-se em crescimento na busca por um tratamento mais seletivo e eficaz para tecidos neoplásicos (CALIXTO *et al.*, 2016).

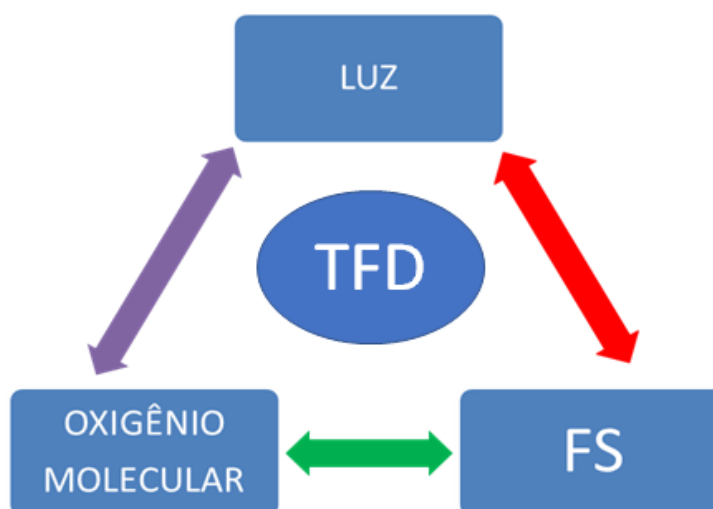
A Terapia Fotodinâmica (TFD) vem se apresentando como modalidade de tratamento de tumores superficiais e infecções, através da combinação de uma substância fotossensível (FS) que é ativada por luz visível, em um comprimento de onda adequado e presença de oxigênio molecular (BENVINDO *et al.*, 2012; DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003). Essa combinação é responsável por gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) e oxigênio singlete, levando a morte do tecido alvo, devido a uma cascata de eventos biológicos apontado como o principal agente citotóxico gerado por fotoprocessos (ROCHA *et al.*, 2017).

O tratamento por TFD é considerado como sendo seletivo, pois os componentes básicos deste fotoprocessos devem ser tóxicos somente quando combinados, ou seja, o dano ocorrerá somente nas células que forem expostas ao FS e à luz, simultaneamente (TOREZAN, 2009). Através da interação de um fotossensibilizador e a luz para produzir espécies reativas de oxigênio e a ocorrência da morte de células seletivas (

Figura 1) (BENVINDO *et al.*, 2012; RAAB, 1900).

De acordo com Oliveira *et al.* (2015) as ftalocianinas são classificadas como fotossensibilizador (FS) de segunda geração são ativos promissores para a utilização na TFD por apresentarem alta taxa de absorção de luz na faixa espectral de 600 a 800 nm (janela terapêutica), alta taxa de rendimento quântico de oxigênio singlete, além de estabilidade físico-química, pureza química e viabilidade econômica (MACHADO, 2000).

Figura 1: Esquema geral da TFD.



Fonte: Elaborado pela autora.

A ftalocianina de cloroalumínio (CIAIPc), em particular, é uma molécula fotossensibilizadora que consiste num macrociclo tetrapirrólico e um metal central (Al^{3+}), onde a incorporação de um metal diamagnético, como o alumínio, no macrociclo, fornece à ftalocianina as propriedades fotofísicas e fotoquímicas mais favoráveis para a aplicação da TFD, tais como alto rendimento quântico do estado triplete alto e longo tempo de vida triplete, bem como alto rendimento de produção de oxigênio singlete e seu tempo de vida relacionados aos estados excitados (BONNETT *et al.*, 1999, SANCHES *et al.*, 2005).

Porém a CIAIPc é hidrofóbica e apresenta uma baixa solubilidade em meio fisiológico (VIOR *et al.*, 2011) que torna inviável sua administração direta na TFD, leva à necessidade de veiculação dos mesmos em sistemas de liberação adequados, que melhor solubilizem e modulem os processos de dissolução e biodistribuição *in vitro* e *in vivo* (CARVALHO *et al.*, 2018).

Toda esta problemática tem motivado um grande esforço dos grupos de pesquisa em todo o mundo para desenvolver um sistema capaz de transportar um composto terapêutico (ativos para câncer e outras doenças, antibióticos, enzimas, hormônios, etc) até um alvo específico (órgão, tecido ou célula), com eficiência e com baixos índices de efeitos colaterais, biocompatibilidade e biodisponibilidade controlável. Estes sistemas são conhecidos como sistemas de liberação controlada (*Drug Delivery Systems – DDS*) (BIZERRA; SILVA, 2016).

Atualmente, materiais inorgânicos porosos estão surgindo como uma nova categoria de sistema de entrega de compostos bioativos devido a algumas características como estabilidade

biológica e propriedade de liberação controlada (COSTA; OLYVEIRA; SALOMÃO, 2017). Estes materiais possuem uma vasta quantidade de nanoporos que permitem a inclusão de compostos bioativos neles.

As micropartículas de CaCO_3 porosas podem ser eficazes para a fabricação de materiais compósitos biocompatíveis devido a sua disponibilidade na natureza como um biomineral e a estrutura adequada do poro para o carregamento de diversos materiais, características que levam as micropartículas de CaCO_3 serem usadas no desenvolvimento de DDS de compostos bioativos (VOLODKIN; LARIONOVA; SUKHORUKOV, 2004).

Suas partículas podem ser encontradas em três diferentes polimorfos: vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$), aragonita ($\lambda\text{-CaCO}_3$) e calcita ($\beta\text{-CaCO}_3$), em uma ampla variedade de tamanho, forma e estrutura cristalina com diferentes propriedades e características (BESSLER; RODRIGUES, 2008). A calcita tem uma estrutura cristalina romboédrica e é o polimorfo termodinamicamente mais estável em condições ambiente (SARAYA; ROKBAA, 2016). A aragonita (estrutura ortorrômbica) se forma a altas temperaturas, enquanto a vaterita (estrutura hexagonal) é o polimorfo mais instável e pode acompanhar a calcita se a precipitação ocorrer em baixa temperatura (BOYJOO; PAREEK; LIU, 2018). Vaterita é um importante material biomédico devido às suas propriedades como área superficial específica elevada, alta solubilidade, alta dispersão e pequena densidade específica sendo utilizada no desenvolvimento de DDS de compostos bioativos (TRUSHINA *et al.*, 2014).

O desenvolvimento e aplicação de micropartículas de carbonato de cálcio para o encapsulamento de compostos ativos em Terapia Fotodinâmica têm sido pouco estudados até o momento. Com base no exposto, o objetivo do projeto foi desenvolver micropartículas porosas de $\mu\text{-CaCO}_3$ para o encapsulamento da ClAlPc como FS para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD).

1.1 Objetivo Geral

O objetivo deste projeto foi investigar um novo sistema de liberação controlada de fármacos, utilizando micropartículas porosas de carbonato de cálcio ($\mu\text{-CaCO}_3$), com enfoque na fase de vaterita, para o encapsulamento da ftalocianina de cloro-alumínio (ClAlPc) como fotossensibilizador (FS) para aplicação em Terapia Fotodinâmica (TFD).

1.2 Objetivos Específicos

- Desenvolver micropartículas de Carbonato de Cálcio ($\mu\text{-CaCO}_3$) pelo método de precipitação química;
- Caracterizar as micropartículas fabricadas por microscopia eletrônica de varredura;
- Caracterizar as fases das micropartículas por difratometria de raios X por DRX;
- Determinar a porosidade aparente das micropartículas $\mu\text{-CaCO}_3$ por BET;
- Incorporar a ftalocianina de cloro alumínio, como modelo de fotossensibilizador, nas micropartículas de $\mu\text{-CaCO}_3$;
- Caracterizar as micropartículas $\mu\text{-CaCO}_3/\text{ClAlPc}$ por técnicas no estado estacionário;
- Avaliar o comportamento citotóxico e fotobiológico das $\mu\text{-CaCO}_3/\text{ClAlPc}$, utilizando os protocolos de TFD;

2 REVISÃO DE LITERATURA

Neste capítulo estão apresentados os relatos científicos sobre o estado da arte de terapia fotodinâmica, fotossensibilizadores, liberação controlada de fármacos e materiais porosos, que nortearam e motivaram o desenvolvimento deste trabalho.

2.1 Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma emergente modalidade terapêutica para o tratamento de doenças neoplásicas e não-neoplásicas, como candidíase, herpes e AIDS (SIBATA *et al.*, 2000; SOLBAN; RIZVI; HASAN, 2006). A TFD tem como objetivo a destruição localizada do tecido anormal, apresentando um tratamento alternativo, quer para tumores de natureza benigna, quer para tumores de natureza maligna (CHARLESWORTH *et al.*, 1994).

A técnica é baseada em um tratamento que envolve luz e uma substância química (um fotossensibilizador), usada em conjunto com o oxigênio molecular para provocar a morte celular. A seletividade baseia-se na capacidade do fotossensibilizador de se acumular preferencialmente no tecido doente e gerar eficientemente oxigênio singlete ou outras espécies altamente reativas, como os radicais, que induzem a morte celular alvo (MATEI *et al.*, 2013).

Desde os anos 80, essa técnica vem sendo considerada promissora para o tratamento dessas doenças (MACHADO, 2000). A TFD contemporânea surgiu pela primeira vez no início do século XX na forma do primeiro fotossensibilizador hematoporfirina (Hp) (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004). A TFD está sendo considerada como tratamento alternativo para o controle de doenças malignas (RIZVI *et al.*, 2010).

A vantagem da TFD no tratamento do câncer é que o fotossensibilizador e a luz são inertes por si só e que a localização do efeito fotodinâmico é considerada sítio-específica (TANAKA *et al.*, 2012). O uso da TFD como terapia é particularmente atraente por causa de sua especificidade e seletividade fundamentais (ALEXIADES-ARMENAKAS, 2006).

A molécula de FS ao ser excitada pela luz em um determinado comprimento de onda, reage com o oxigênio molecular e gera espécies oxidantes nos tecidos alvos, levando à morte celular (AGOSTINIS *et al.*, 2004), e conduzem a destruição seletiva do tumor, devido a uma

sucessão de eventos biológicos, incluindo citotoxicidade direta, dano vascular e resposta do sistema imunológico relacionados ao comportamento fotoquímico e fotofísico do fármaco no estado excitado (ABELS, 2004; LUKSIENE, 2003).

A TFD quando comparada às terapias convencionais (quimioterapia, radioterapia e cirurgia) diferentemente dessas terapias não apresenta graves efeitos colaterais e nem possui eficiência limitada para o tratamento de tecidos neoplásicos (LOPES; LOBO; COSTA, 2005).

A TFD apresenta algumas vantagens sobre as terapias convencionais:

- Particularidade pelo tumor, permitindo que o tratamento de tumores seja analisado de forma específica quando estes tumores forem localizados;
- Completa renovação do tecido normal após o tratamento;
- Repetição da terapia, sem efeito tóxico cumulativo;
- Relação custo-benefício, sendo ele favorável;
- O sucesso no tratamento e altas taxas de cura;
- Indução de imunização, evitando os efeitos imunossupressores;
- É uma terapia ambulatorial (SVENSON, 2009).

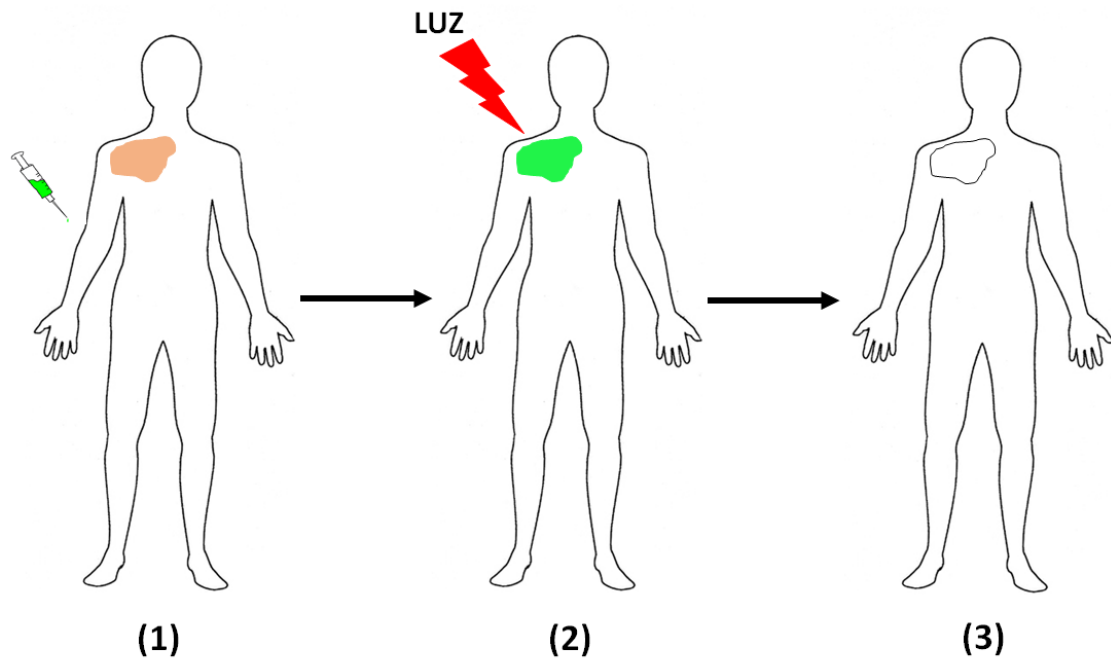
A TFD possui também algumas desvantagens: (i) o FS frequentemente usado no tratamento são moléculas insolúveis em água e, conseqüentemente, sua injeção no corpo não é fácil; (ii) pacientes que são tratados com o FS disponível podem ficar sensíveis à luz por um tempo, portanto, precauções de exposição à luz devem ser tomadas após o tratamento; (iii) falta de especificidade da célula-alvo FS; e (iv) penetração limitada da luz nos tecidos se a luz convencional (600-700 nm) for usada, porque ela não pode penetrar mais profundamente que 10 mm na pele para alcançar o local do tumor, limitando a TFD para tratar apenas tumores superficiais, como câncer de pele, câncer bucal (HUANG; CHEN; LIN, 2013; LAPTEV *et al.*, 2006). A TFD tem sido usada para tratar outros tipos de câncer, como tumores digestivos, câncer de próstata e tumores cerebrais (AGOSTINIS *et al.*, 2011).

No entanto, como toda terapia, a TFD tem algumas limitações. O efeito fotodinâmico ocorre seletivamente no local irradiado, o que impossibilita a utilização da TFD em metástases com a tecnologia atualmente disponível, e isso não permite a irradiação do corpo inteiro com a intensidade luminosa adequada (BROWN; BROWN; WALKER, 2004).

A TFD é baseada no seguinte protocolo: (1) um fotossensibilizador (FS) é introduzido no paciente (via oral, sistêmica ou endovenosa); (2) após um tempo de espera (tempo de *delay*), a região alvo é irradiada com luz na região vermelha do espectro eletromagnético, (3) levando a morte celular pela ação de espécies reativas de oxigênio (Figura 2) (STERNBERG;

DOLPHIN; BRUCKNER, 1998), sendo que a dosagem de ativo aplicada e as características do laser (tipo, dosagem de potência e tempo de iluminação) dependem do FS que está sendo aplicado e da espécie e gravidade da doença tratada (MACHADO, 2000).

Figura 2: Protocolo de aplicação da Terapia Fotodinâmica.



Fonte: Elaborado pela autora.

A TFD oferece um efeito terapêutico aprimorado via captação preferencial do fotossensibilizador por: (i) morfologia do tecido alvo; (ii) iluminação específica do tecido alvo; (iii) momento estratégico da dose de luz aplicada; (iv) aplicação tópica do fotossensibilizador; e (v) manipulação química da estrutura do fotossensibilizador (DOUGHERTY *et al.*, 1998). A localização do fotossensibilizador nos tecidos e células desempenha um papel significativo nos mecanismos e na eficácia da morte celular, crucial para a TFD eficaz (SHARMAN; ALLEN; VAN LIER, 1999).

No Brasil, o Hospital Amaral Carvalho, em Jaú – SP é considerado referência em oncologia, oferece desde 2008, a TFD como tratamento para os tumores de pele do tipo não melanoma em fase inicial, sendo que esta tecnologia pode ser incorporada ao Sistema Único de Saúde (SUS), e que a mesma já foi reconhecida pelo Conselho Federal de Medicina e pela Sociedade Brasileira de Cancerologia. Embora o câncer de pele não melanoma (CPNM) seja o câncer mais comum em pessoas de pele branca, com taxas de incidência crescentes em todo o mundo, sua incidência é difícil de estimar. Atualmente, entre 2 e 3 milhões de pessoas

desenvolvem câncer de pele do tipo não melanoma. A cada três cânceres diagnosticados, um é câncer de pele (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

O câncer da pele responde por 33% de todos os diagnósticos desta doença no Brasil, sendo que o Instituto Nacional do Câncer (INCA) registra, a cada ano, cerca de 180 mil novos casos. A doença é provocada pelo crescimento anormal e descontrolado das células que compõem a pele.

2.1.1 Mecanismo da ação na Terapia Fotodinâmica

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma forma moderna e não invasiva de terapia que emergiu como uma modalidade terapêutica promissora para o tratamento de doenças oncológicas e não-oncológicas (DOUGHERTY *et al.*, 1998).

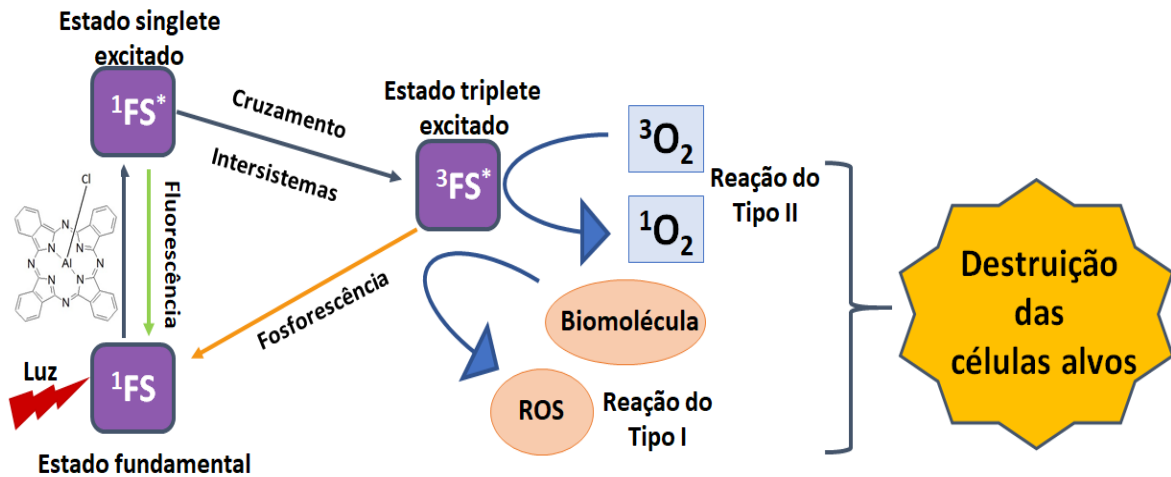
A TFD é baseada na administração de um agente fotossensibilizante em um tecido tumoral seguida da ativação desse agente por uma luz com comprimento de onda específico, do composto fotossensível, o fotossensibilizador acumula-se preferencialmente nas células tumorais após sua administração tópica ou sistêmica (KHARKWAL *et al.*, 2011). Onde as moléculas do fotossensibilizador absorvem a luz do comprimento de onda apropriado, iniciando os processos de ativação que levam à destruição seletiva das células lesadas. Devido a sua ação seletiva, a terapia fotodinâmica é bem aceita pelos pacientes (SPERANDIO; HUANG; HAMBLIN, 2013). Os protocolos fotodinâmicos são eficientes e indolores, e a simplicidade de sua aplicação permite o uso ambulatorial.

O processo fotodinâmico é iniciado pela absorção de luz pelo FS no estado fundamental, o qual é promovido para um estado excitado de vida curta. A partir deste estado, o FS pode retornar para o estado fundamental, pela emissão de luz (fluorescência) ou pode sofrer um cruzamento intersistema para o estado excitado triplete, o qual é mais estável e apresenta tempo de vida mais longo (AGOSTINIS *et al.*, 2011).

Existem dois mecanismos principais da reação fotodinâmica. Ambos são intimamente dependentes das moléculas de oxigênio dentro das células. O primeiro estágio de ambos os mecanismos é semelhante. O fotossensibilizador depois de entrar na célula, é irradiado com um comprimento de onda de luz que coincide com o máximo de absorção do FS e é convertido do estado fundamental singlete para o estado singlete excitado por causa da absorção de fótons (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009). Parte da energia é perdida na forma de fluorescência, e a energia restante direciona uma molécula de

fotossensibilizador para o estado tripleto excitado - a forma terapêutica adequada do composto (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005). Além disso, moléculas no estado tripleto excitado podem sofrer reações do tipo I e II (Figura 3).

Figura 3: Diagrama de Jablonski ilustrando as reações fotoquímicas a partir da excitação de fotossensibilizadores.



Fonte: Elaborado pela autora.

A reação tipo I é uma reação direta do FS excitado com uma biomolécula por um mecanismo que envolve a transferência de elétrons para espécies reativas de oxigênio (EROs), como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($\bullet O_2$) e o radical hidroxila ($\bullet OH$). A reação do tipo II resulta da transferência de energia do FS tripleto excitado ao oxigênio molecular para produzir oxigênio singleto (1O_2). Estas reações induzem um encadeamento de reações oxidativas que ocasionam inviabilização das células alvo (RIBEIRO; JORGE, 2005). Sendo que os fatores que determinam a morte das células alvo estão diretamente relacionados com o tipo de molécula de FS, da condição do local e da dosimetria luminosa aplicada durante o processo da terapia (SELLERA; GARGANO; POGLIANI, 2014). As reações do Tipo I ocorrem em cerca de 5% da reação e para os outros 95%, ocorre o mecanismo Tipo II, onde é responsável pelo apoptose celular que, diferentemente da necrose não provoca injúria aos tecidos adjacentes (KÜBLER *et al.*, 1998).

2.1.2 Fotossensibilizadores

Os fotossensibilizadores (FS) são compostos atóxicos ou pouco tóxicos, que em seu estado fundamental são inativos e apresentam a característica de absorção da luz nas regiões do infravermelho, visível ou radiação ultravioleta (JORI, 2006) e possuem a capacidade de induzir ou de participar de mecanismos fotoquímicos e fotoprocessos (MACHADO, 2000).

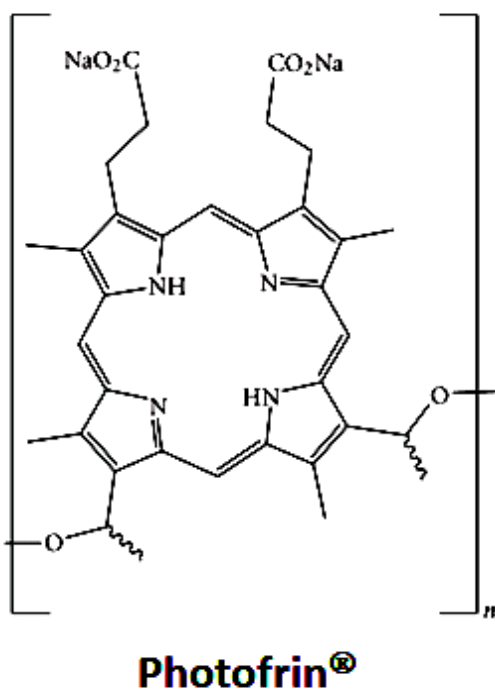
Os fotossensibilizadores apresentam como principal característica a capacidade de se acumular preferencialmente no tecido tumoral e produzir agentes citotóxicos para induzir a morte do tecido tumoral onde se acumulou (SHARMAN ALLEN; VAN LIER, 1999). Estes compostos são moléculas capazes de interagir com a luz, na presença de oxigênio molecular, de maneira que podem gerar espécies altamente reativas de oxigênio, como o oxigênio singlete e outras formas radicalares (SILVA, 2007).

Alguns pré-requisitos para um fotossensibilizador ideal incluem pureza química, seletividade para células tumorais, estabilidade química e física, curto intervalo de tempo entre administração e acúmulo máximo dentro do tecido-alvo, ativação em comprimentos de onda com penetração maximizada no corpo (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004).

A natureza da TFD requer a localização eficiente de um fotossensibilizador no tecido alvo, a fim de obter uma resposta satisfatória (SVANBERG *et al.*, 1998). Idealmente, os fotossensibilizadores devem ser retidos pelo tecido doente por períodos mais longos em comparação com o tecido saudável (BONNETT; MARTÍNEZ, 2001). Assim, a exposição à luz cuidadosamente programada é vital para garantir que a ativação do fotossensibilizador ocorra apenas quando a proporção de fotossensibilizador no tecido doente for maior do que no tecido saudável, minimizando os danos indesejados às células saudáveis (ETHIRAJAN, 2011).

O avanço da TFD começou com a descoberta dos derivados da hematoporfirina (HpD) uma mistura complexa de porfirinas. O primeiro fármaco aprovado e introduzido na terapia fotodinâmica (TFD), é representado pelo Photofrin[®] (Figura 4), o qual apresenta uma mistura de moléculas fotoativas que absorvem em comprimentos de onda de até 630 nm. Destaca-se os compostos derivados de Hematoporfirina classificados como primeira geração de fármacos fotossensíveis (NUNEZ; GARCEZ; RIBEIRO, 2015).

Figura 4: Estrutura química do Photofrin[®] classificado como fotossensibilizador de 1^a geração.

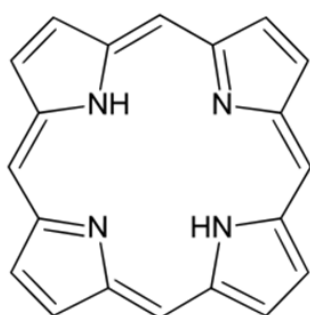


Fonte: Elaborado pela autora.

Levando em consideração que quanto maior o comprimento de onda, maior a capacidade de penetração da luz nos tecidos, a região de absorção do Photofrin[®] absorve na região de 630 nm, não é tão satisfatória pelo fato de precisar de doses mais elevadas (ROCHA *et al.*, 2015) para atingir o efeito fotodinâmico desejado, apresentando sensibilidade cutânea por várias semanas (SENGE, 2012), sendo formado por uma mistura complexa de porfirinas, monômeros e oligômeros (KOLAROVA *et al.*, 2007). O Photofrin[®] já foi aprovado para uso clínico em mais de 40 países e sua aplicação é feita em tratamento de tumores sólidos, incluindo tumores de pulmão, estômago, esôfago e colo de útero (BANFI *et al.*, 2007).

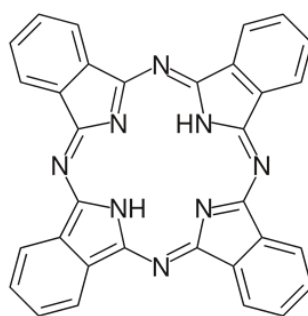
Segundo Setúbal (2007), visando á busca de novas drogas fotossensíveis e compostos com propriedades fotofísicas melhoradas em relação ao Photofrin[®], originou-se a chamada segunda geração de fotossensibilizadores, apresentando uma absorção de luz na região de 600-800 nm (intervalo chamado de “janela fototerapêutica”), onde a penetração de luz nos tecidos é maximizada sem a interferência de cromóforos endógenos (SZACILOWSKI *et al.*, 2005), tais como as ftalocianinas (MARTI *et al.*, 2000) clorinas e bacterioclorinas (MACHADO *et al.*, 2010) (Figura 5).

Figura 5: Núcleos básicos de fármacos fotossensibilizadores utilizados na TFD.



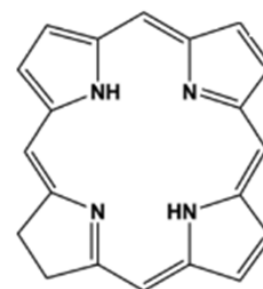
Porfirina

$\lambda_{\text{máx}} = 400 \text{ nm}$



Ftalocianina

$\lambda_{\text{máx}} = 675 \text{ nm}$



Clorina

$\lambda_{\text{máx}} = 640\text{-}700 \text{ nm}$

Fonte: Elaborado pela autora.

Os fármacos fotossensibilizadores devem apresentar algumas propriedades ideais para a sua aplicação em protocolos de TFD tais como: baixa toxicidade no escuro (ISHII, 2012), alta fototoxicidade (DI MASCIO *et al.*, 1994); alta seletividade e especificidade para o tumor alvo (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003); rápida eliminação do corpo (LEMP *et al.*, 2008); absorção de luz na janela terapêutica (DURMUS *et al.*, 2011); alto rendimento quântico de produção de oxigênio singlete (MATLABA; NYOKONG, 2002); solubilidade em soluções à base de água e estabilidade em condições fisiológicas (CAMERIN *et al.*, 2010), obtenção industrial com custos reduzidos, apresentando facilidade e uma boa reprodutibilidade na produção (USADA *et al.*, 2006).

As ftalocianinas apresentam íons metálicos diamagnéticos como metal central, o que reduz efeitos colaterais citotóxicos, apresentando, por exemplo: alto potencial na TFD em modelos de tumores animais (YAVLOVICH *et al.*, 2010).

2.1.3 Ftalocianinas

As ftalocianinas são macrociclos altamente conjugados com estabilidade térmica e química, apresentando propriedades que permitem que sejam aplicadas em muitos campos diferentes, como o uso de fotossensibilizador em Terapia Fotodinâmica (MACK; KOBAYASHI, 2011).

As ftalocianinas são compostos análogos das porfirinas. Diferentemente das porfirinas, as ftalocianinas não são encontradas na natureza, devido à ausência dos principais precursores

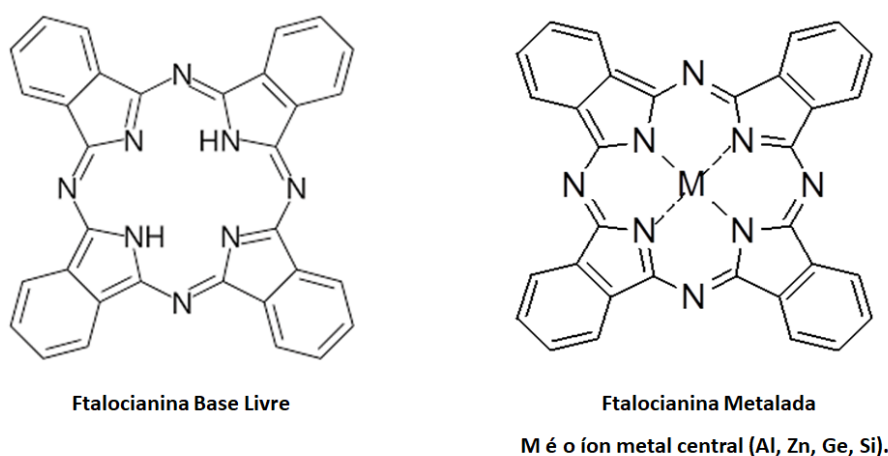
da ftalocianina na natureza (MOSER; THOMAS, 1963). Os derivados de ftalocianina compreendem a segunda geração de fotossensibilizador e atraíram muita atenção devido ao seu excelente desempenho como fotossensibilizante.

As ftalocininas são consideradas excelentes fármacos fotossensíveis para TFD devido a sua estabilidade físico-química, pureza e viabilidade econômica (VAN LIER; SPIKES, 1989), sendo favoráveis para aplicação em fotoprocessos, como TFD, por apresentarem elevada geração de oxigênio singlete (PERUSSI, 2007), elevada absorção de luz na faixa de 600-800 nm, região onde a penetração de luz é maximizada (IBANEZ SIMPLICIO; MAIONCHI; HIOKA, 2002) levando uma elevada resposta fototerápica. Além disso, possuem absorção e emissão na faixa de 660 a 750 nm, tornando-os sensíveis à luz, que pode penetrar profundamente nos tecidos vivos (JORI, 1992).

As ftalocianinas apresentam como característica uma estrutura molecular que pode ser modificada, adicionando os ligantes periféricos e/ou axiais, bem como metais entre quatro nitrogênios centrais (Figura 6).

De acordo com Oliveira *et al.* (2015), a estrutura molecular das ftalocianinas é semelhante a das porfirinas: apresenta um macrociclo tetrapirrólico com átomos de nitrogênio ligando as subunidades pirrólicas no lugar das pontes de metileno presentes nas porfirinas, como aplicação com área: industrial, tecnológica e médica (ÇAMUR *et al.*, 2011).

Figura 6: Estrutura molecular das ftalocianinas base livre e metaladas.



Fonte: Elaborado pela autora.

As ftalocianinas complexadas com metal que apresentam as propriedades fotofísicas mais favoráveis para a aplicação na TFD, são os complexos de Al (III), Ge (IV), Si (IV), e Zn

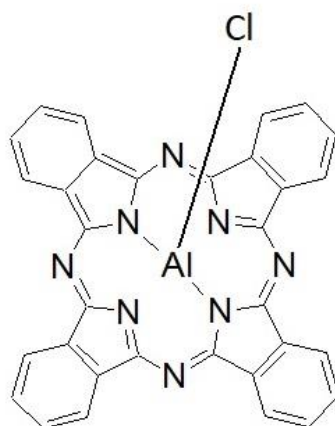
(II), onde o tempo de meia-vida de seu estado excitado apresenta uma melhor performance, o que as torna forte candidatas como FS para TFD (OGUNSIPE; NYOKONG, 2005).

A periferia do macrociclo é estendida por anéis benzênicos que aumentam a absorção em comprimentos de onda na região do vermelho do espectro visível (MIRONOV; NECHAEV, 2001) de modo que a sua absorção máxima ocorre em comprimentos de onda maiores do que o das porfirinas (SHARMAN; ALLEN; VAN LIER, 1999).

Vários estudos demonstram que a solubilidade da ftalocianina desempenha um papel importante na determinação de suas propriedades espectrais, químicas, físicas e biológicas (SHARMAN; ALLEN; VAN LIER, 1999). Além disso, suas propriedades fotofísicas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central o que interfere diretamente no rendimento quântico e tempo de vida de estado excitado tripleto (PRIMO, 2006).

Nesse trabalho, foi utilizado como FS a Cloro Alumínio Ftalocianina (CIAIPc), que apresenta na estrutura mostrada na (Figura 7).

Figura 7: Estrutura química do cloro alumínio ftalocianina (CIAIPc).



Fonte: Elaborado pela autora.

Entretanto, assim como a maioria dos fotossensibilizadores de segunda geração, a CIAIPc é altamente hidrofóbica, ou seja, apresenta baixa solubilidade em água. Uma vertente para solucionar esse problema de solubilidade em soluções aquosas causado por sua elevada hidrofobicidade, a CIAIPc foi avaliada incorporada em diferentes sistemas de liberação controlada, chamados de *Drug Delivery Systems* (DDS) (TSUBONE *et al.*, 2014).

Entretanto, esses fotossensibilizadores chamados de primeira geração, apresentam algumas desvantagens com relação ao seu uso em TFD, como baixa seletividade ao tecido

alvo e baixa absorção de luz na região do vermelho. Com isso os compostos derivados da Hematoporfirina levaram ao desenvolvimento de novas moléculas, com propriedades mais atrativas (DABROWSKI *et al.*, 2012).

2.1.4 Cloro Ftalocianina de Alumínio (CIAIPc)

Na TFD um dos fotossensibilizadores que tem se mostrado eficaz e se destacado promissor como fotossensibilizador para a eliminação de células neoplásicas é a Cloro Alumínio Ftalocianina (CIAIPc) (MUEHLMANN *et al.*, 2014). A CIAIPc é um composto encontrado com alta pureza, muito estável quimicamente e apresenta uma baixa citotoxicidade na ausência de luz (De PAULA, 2008).

A CIAIPc é um fotossensibilizador derivado da classe das ftalocianinas e apresenta diversas vantagens quanto ao seu emprego na TFD, tais como rendimento quântico de estado triplete elevado e longo tempo de vida no estado triplete, bem como alto rendimento de produção de oxigênio singlete (SIBATA; TEDESCO; MARCHETTI, 2004).

Devido a interações eletrônicas entre os anéis de duas ou mais moléculas, a hidrofobicidade da CIAIPc viabiliza a formação de agregados fotoquimicamente inativos em solução aquosa (TAPAJÓS *et al.*, 2008). A baixa solubilidade em água da CIAIPc impede frequentemente a sua aplicação direta no tecido biológico alvo (SINGH; SETTLEMAN, 2010). Devido à insolubilidade das ftalocianinas em ambiente aquoso (meio fisiológico) há a necessidade de vinculá-las em sistemas de liberação (SIMIONI *et al.*, 2008). Como a maioria dos fotossensibilizadores Alumínio-Cloro Ftalocianina (CIAIPc) dessa classe, uma molécula hidrofóbica que por sua vez pode facilmente agregar em meio aquoso devido a fortes interações e suas moléculas (CHEN *et al.*, 2007).

Com tudo, essa propriedade compromete sua administração intravenosa que necessita de meio fisiológico dificultando a aplicação em TFD (VIOR *et al.*, 2011).

Várias estratégias de encapsulamento em sistemas nanoestruturados foram utilizadas buscando a melhoria na solubilidade e biodisponibilidade de compostos lipofílicos (GHALANDARLAKI; ALIZADEH; ASHKANI-ESFAHANI, 2014).

A tecnologia de liberação controlada de fármacos, conhecida como (DDS), vem contribuindo para o avanço da saúde humana e tem se favorecido diretamente com os avanços da nanobiotecnologia (CHEN *et al.*, 2007). O uso da nanotecnologia na entrega do fotossensibilizador é uma abordagem atraente, pois os nanomateriais podem satisfazer a

necessidade de aumentar a eficácia da TFD (LI, 2009). O fotossensibilizador apresentando um direcionamento aprimorado ajuda a evitar danos ao tecido saudável circundante à lesão e a reduzir a dose de drogas e luz (CHENG *et al.*, 2007) aplicadas durante o protocolo de TFD.

2.2 Sistemas de liberação controlada de fármacos

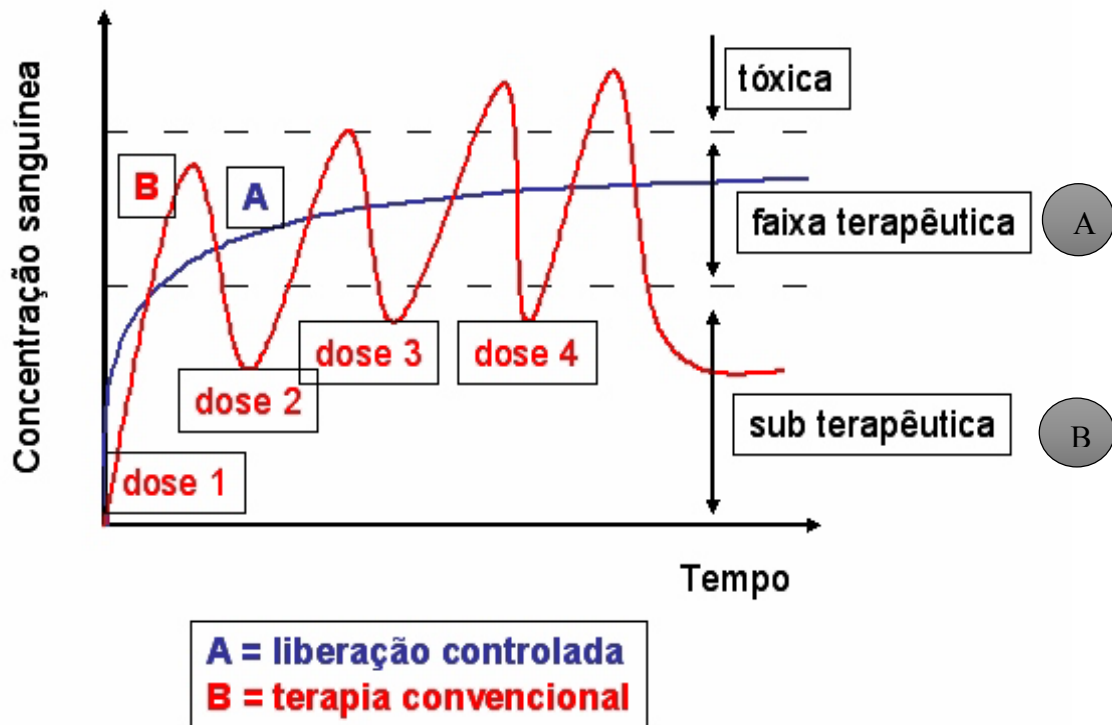
Uma das ferramentas para a eficácia da TFD destaca-se a tecnologia de liberação controlada de fármacos a qual representa uma das fronteiras da ciência, um incremento notório na tentativa de maximizar as vantagens inerentes às formas farmacêuticas tradicionais (LOPES; LOBO; COSTA, 2005) e como isso pode contribuir muito para o avanço da saúde humana.

Os sistemas de liberação (DDS) oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de dosagem convencional (STEVANOVIC *et al.*, 2008).

A concentração terapêutica é desejada por um longo período, visando uma maior eficácia no tratamento e minimizando efeitos colaterais, maximização da ação farmacológica; proteção contra a degradação prematura do fármaco no organismo; administração mais segura e conveniente, com diminuição do número de doses e manutenção do nível terapêutico (AZEVEDO, 2005). A concentração terapêutica é mantida por um curto período, sendo necessárias doses extras para que a concentração permaneça nesta faixa, e quando há o decaimento para o nível sub-terapêutico a aplicação de uma nova dosagem do medicamento é administrada (FREITAS; MERKLE; GANDER, 2005).

Cada fármaco apresenta uma faixa de ação terapêutica acima da qual ela é tóxica e abaixo da qual ela é ineficaz, sendo que os níveis no organismo são dependentes das dosagens administradas. O objetivo dos sistemas de liberação controlada é manter a concentração do fármaco entre estes dois níveis por um tempo prolongado, utilizando-se de uma única dosagem e minimizando os efeitos colaterais (Figura 8).

Figura 8: Concentração do fármaco: liberação controlada (A) e terapia convencional (B).



Fonte: adaptado de Brannon-Peppas (1997).

A vantagem do desenvolvimento de DDS é que eles permitem o uso de compostos já consolidados como excelentes princípios ativos e que deixaram de serem utilizados por apresentarem efeitos colaterais, ou mesmo por terem sido substituídos por novos fármacos (SINGH *et al.*, 2005).

Comparados às terapias convencionais, os sistemas de liberação controlada demonstraram o potencial de enfrentar alguns desses desafios, melhorando a eficácia do tratamento e evitando a toxicidade em células normais devido a características como alta acumulação seletiva em tumores por meio do efeito aprimorado de permeabilidade e retenção (EPR) e captação celular ativa (KOO *et al.*, 2011).

Algumas formas farmacêuticas são destinadas à liberação do fármaco, sendo que algumas são formuladas para uma liberação lenta e gradual, controlando a velocidade de absorção durante um determinado período (ANSEL; POPOVICH; ALLEN, 2007). Dentre estes sistemas estão incluídos lipossomas, emulsões e sistemas poliméricos, que vêm demonstrando ser bastante promissores para a liberação controlada de fármacos (WANG *et*

al., 2006). Em 1952, a Smith Klein Beecham introduziu a primeira formulação de liberação sustentada que foi capaz de controlar a cinética de liberação do fármaco e obter eficácia diminuindo os efeitos indesejáveis resultantes de sua ação em outros sítios (LEE; KABALAH, 2013).

O objetivo de qualquer sistema de liberação controlada é fornecer uma quantidade de medicamento no local apropriado do corpo e, em seguida, manter o medicamento desejado na concentração desejada (LEE; ROBINSON, 2002). Nas diversas situações que envolvem o domínio de conhecimentos associados a áreas científicas como a medicina, farmácia, bioquímica, química, e outras, a área da liberação controlada de fármacos é considerada uma área inerentemente interdisciplinar (COIMBRA, 2010).

As propriedades dos sistemas de liberação de fármacos uma atenção especial e primordial no mercado atualmente, tornando-se um tema que recebeu grande destaque nas últimas décadas no setor farmacêutico, devido aos grandes benefícios terapêuticos e às vantagens econômicas associadas a essa prática (SOUZA *et al.*, 2008).

A teoria da incorporação de bioativos em polímeros inclui adsorção (KARIMI; TAHERZADEH, 2016), dispersão do componente ativo na matriz e encapsulamento em sistemas de liberação controlada (NEUBAUER; MEMARIZADEH; FERY, 2014). A busca por formas diferenciadas e mais efetivas de liberação, de forma que a droga possa atingir seu local de ação, na proporção e tempo esperado é um foco de expectativas de desenvolvimento de novos tratamentos medicamentosos e aprimoramento das formulações já existentes.

Diversos sistemas para a encapsulação da CIAIPc já foram propostos, como lipossomas (EDWARDS; BAEUMNER, 2006), nanopartículas de albumina (SAIF, 2013), nanopartículas de gelatina (NPGs) (YAO *et al.*, 2004), nanoemulsão (SOLANS; SOLÉ, 2012) e microesferas polieletrólíticas (ROSSANEZI, 2008).

As $\mu\text{-CaCO}_3$ vem se destacando eficaz como recipientes para o encapsulamento de materiais biologicamente ativos uma vez que mostram uma estrutura porosa e uma série de vantagens como biocompatibilidade, isto é, um biomaterial não cause reações adversas, atóxicas, simplicidade na preparação e baixo custo de produção (VOLODKIN *et al.*, 2004). Com tudo não foram ainda desenvolvidas até o momento micropartículas de carbonato de cálcio na fase vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$) encapsuladas com fotossensibilizadores como candidatos a DDS para aplicação em terapia fotodinâmica (TFD). O carbonato de cálcio é encontrado em três morfologias: calcita romboédrica, aragonita, na forma de agulha, e vaterita esférica, sendo

que a calcita é a forma mais estável do carbonato de cálcio (CHONG; SHEIKHOESLAMI, 2001; XIANG *et al.*, 2002).

2.3 Materiais Porosos

Nas últimas décadas, os materiais porosos mostraram uma grande promessa de oferecer soluções sustentáveis para questões globais, incluindo o aumento da demanda (SLATER; COOPER, 2015) de energia e, simultaneamente, padrões para poluentes industriais, esgotamento de recursos e melhoria da saúde (CHEN *et al.*, 2016).

Devido à propriedade estrutural única de partículas porosas, como tamanho uniforme dos poros (JAFARI *et al.*, 2016) e uma estrutura de poros ordenada, essas estruturas porosas foram empregadas e estudadas em uma ampla variedade de campos diferentes, desde catálise, adsorção, separação, detecção a aplicações biomédicas (YANG; GAI; LIN, 2012).

Atualmente, alguns materiais inorgânicos porosos estão surgindo como uma nova tecnologia de sistema de entrega de compostos bioativos devido a algumas características como estabilidade biológica e propriedade de liberação controlada (COSTA; OLYVEIRA; SALOMÃO, 2017).

Estes materiais possuem uma vasta quantidade de nanoporos, isto é, são materiais que contém poros (vazios) que permitem a inclusão de compostos bioativos. Como exemplo as partículas precipitadas de (CaCO_3) as quais apresentam aplicações em sistemas de liberação de fármacos, devido as suas características tais como: distribuição de tamanho, fase cristalina e área superficial específica, parâmetros estes que podem ser ajustados durante a síntese (COSTA; OLYVEIRA; SALOMÃO, 2017).

As micropartículas por apresentar suas propriedades atraentes ocupam uma posição única na tecnologia de administração de medicamentos (BIRNBAUM; BRANNON-PEPPAS, 2003).

Os materiais porosos oferecem um meio potencial para aumentar a dissolução do fármaco pouco solúvel por meio de efeitos na área superficial ou na cristalinidade. A liberação do medicamento pelo transportador poroso pode estar completa dentro de 10 minutos ou incompleta após várias horas ou dias. A polaridade do solvente e as propriedades da superfície desempenham um papel importante na adsorção e liberação dos transportadores porosos (CHARNEY *et al.*, 2003).

O CaCO_3 também ocorre na fase amorfa (ACC – Carbonato de Cálcio Amorfo). A calcita é a mais abundante, cristaliza de acordo com o sistema triclinico e possui uma densidade de $2,71 \text{ g/cm}^3$. Muito menos abundante do que a calcita é a aragonita, um polimorfo ortorrômbico com uma densidade de $2,93 \text{ g/cm}^3$. O terceiro polimorfo é vaterita, hexagonal e com densidade de $2,54 \text{ g/cm}^3$. Aragonita e vaterita são metaestáveis à temperaturas ambientes normais (FIONA; HELMUT, 2008).

O carbonato de cálcio é mineral importante para o processo de biomineralização, pois apresenta uma estrutura micro-porosa que é facilmente solúvel em pH ácido (em torno de 4 e 5) e pouco solúvel em pH neutro (ZHANG; GUO, 2012). Sendo a biomineralização como uma precipitação biologicamente na qual um organismo cria um micro ambiente local, como condições que permitem a precipitação química extracelular ideal de fases minerais, como o carbonato de cálcio (CaCO_3) (LOWENSTAM; WEINER, 1989).

As micropartículas de CaCO_3 porosas podem ser eficazes para a fabricação de materiais compósitos biocompatíveis devido a sua disponibilidade na natureza como um biomíneral e a estrutura adequada para carregar diversos materiais (CAI *et al.*, 2008), características que levam as micropartículas de CaCO_3 serem usadas no desenvolvimento de sistemas de liberação controlada de compostos bioativos (WANG, *et al.*, 2006; VOLODKIN *et al.*, 2004).

Estudos recentes utilizando carbonato de cálcio estão sendo desenvolvidos para aplicação desse mineral em sistemas farmacêuticos e biomédicos, além de apresentar-se como um material biodegradável e biocompatível. A utilização do carbonato de cálcio em sistemas farmacêuticos pode controlar a liberação de fármacos devido suas características relacionadas ao pH (QIU *et al.*, 2012).

As partículas de CaCO_3 podem ser encontradas em três diferentes polimorfos: vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$), aragonita ($\lambda\text{-CaCO}_3$) e calcita ($\beta\text{-CaCO}_3$), com uma grande variedade de tamanho, forma e estrutura cristalina com as diferentes propriedades e características (BESSLER; RODRIGUES, 2008). A vaterita altamente porosas tem sido amplamente utilizada em aplicações como transportadoras de encapsulamento para vários fármacos (QIU *et al.*, 2012).

A fase mais atraente do CaCO_3 como matriz para a fabricação de materiais multifuncionais, com um morfologia esférica e superfície porosa é a forma de vaterita metaestável. A vaterita passa facilmente pela transição de fase para a fase mais termodinamicamente estável da calcita, a qual não apresenta a morfologia esférica porosa como a vaterita (VOLODKIN *et al.*, 2004).

A calcita tem uma estrutura cristalina romboédrica e é o polimorfo mais termodinamicamente estável em condições ambiente (SARAYA; ROKBAA, 2016). A aragonita (estrutura ortorrômbica) se forma a altas temperaturas, enquanto a vaterita (estrutura hexagonal) é o polimorfo mais instável e pode acompanhar a calcita se alguns parâmetros durante a precipitação não forem controlados, como por exemplo: temperatura, tempo de reação e agitação utilizada no processo (WANG *et al.*, 2006).

A calcita é a fase termodinamicamente estável em todas as temperaturas, com tendência de formação de aragonita a partir de soluções aquosas em temperaturas elevadas (LIPPMANN, 1973).

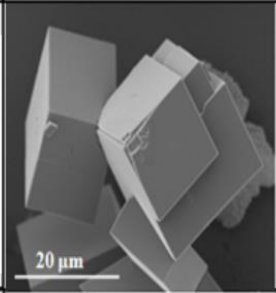
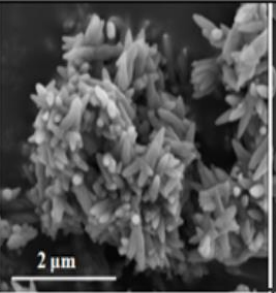
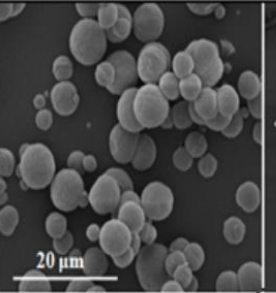
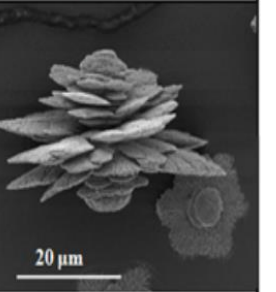
Já a obtenção da fase metaestável de aragonita é identificada através dos efeitos cinéticos, isto é, nessas condições tanto a nucleação como o crescimento dos cristais de aragonita acontece mais rapidamente em comparação à calcita (BESSLER; RODRIGUES, 2008).

O terceiro polimorfo, a vaterita, é um mineral mais escasso que pode ser formado a partir de carbonato de cálcio amorfo, pois possui uma estrutura termodinamicamente instável, com capacidade de transformar-se rapidamente em calcita ou aragonita em solução aquosa (QIU *et al.*, 2012). Sua estabilização pode ser realizada por uma variedade de moléculas orgânicas hidrofílicas (HAZEN *et al.*, 2013).

Segundo Kabalab, (2013) identificou que a vaterita é composta de uma grande fase de simetria hexagonal preenchida com nanodomínios amorfos. Diferentemente dos polimorfos da calcita e aragonita que têm cristais facetados, partículas de vaterita são geralmente esféricas ou irregulares (LEEuw; PARKER, 1998), conforme (

Figura 9).

Figura 9: Polimorfismo do carbonato de cálcio (CaCO_3).

	Cúbica	Vara	Esfera	Flor
Formas do CaCO_3				
A	2-20 μm	2,1- 3 μm	0,2 - 5 μm	20-100 μm
B	Calcita ($\beta\text{-CaCO}_3$)	Aragonita ($\lambda\text{-CaCO}_3$)	Vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$)	Vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$)
C	Romboédrica	Ortorrômica	Hexagonal	Hexagonal

* A, diâmetro médio; B, fase cristalina; C, sistema cristalino

Fonte: adaptado de Costa, Olyveira e Salomão. (2017).

No entanto, partículas de vaterita foram apontadas como tendo enorme potencial para ser usado como sistema de liberação controlada de compostos bioativos (WANG *et al.*, 2006). Esse potencial decorre de sua menor estabilidade termodinâmica, alta solubilidade e rica em defeitos microestrutura que pode acomodar muitas moléculas hospedeiras e liberá-lo de forma controlada (PENG; ZHAO; GAO, 2010). A vaterita vêm se tornando um dos mais importantes materiais biomédicos devido às suas propriedades como área superficial específica elevada (FALINI *et al.*, 1996), alta solubilidade (WANG *et al.*, 2008), alta dispersão e pequena densidade específica (TRUSHINA *et al.*, 2014) e devida sua

instabilidade não é normalmente sintetizada por organismos vivos (FALINI *et al.*, 1996). Vários estudos mostram que partículas de vaterita podem ser encapsuladas ou ligadas a várias substâncias biológicas como biopolímeros, proteínas e polieletrólitos (MARUYAMA *et al.*, 2010).

As principais vantagens das partículas de vaterita são a facilidade e preparação de baixo custo, capacidade de projetar partículas com características definidas, estrutura porosa, condições de decomposição, não toxicidade e biocompatibilidade (TRUSHINA *et al.*, 2014).

A vaterita pode ser estabilizada com vários compostos, entre eles a glicina, proteínas, surfactante catiônico (dodecil benzeno sulfonato de sódio - PAH) e surfactante aniônico como o poli (4-estirenosulfonato de sódio) (PSS) (COSTA; OLYVEIRA; SALOMÃO, 2017). A porosidade das μ -CaCO₃ é uma característica fundamental por apresentar propriedades de absorção e adsorção de fármacos (VOLODKIN *et al.*, 2004).

Somente a utilização de CaCO₃ como matriz para processos de absorção não apresenta resultados tão satisfatórios. Devido a essas razões a mistura de biopolímeros com CaCO₃ tornou-se uma alternativa na produção de partículas mais eficientes e com melhores resultados (ISLAM *et al.*, 2015).

As nano/micropartículas de carbonato de cálcio podem ser produzidas por muitos métodos, baseados em processos químicos ou biológicos, resultando em uma ampla gama de características (distribuição de tamanhos, fase cristalina, morfologia, área superficial específica, porosidade interna e solubilidade) (PENG; ZHAO; GAO, 2010).

Tais partículas encontram enormes aplicações nos sistemas de liberação de fármacos, tanto como principais unidades hospedeiras de microcápsulas ou em combinação com polímeros e outras macromoléculas (HENCH; BEST, 2013). Entre os polimorfos de CaCO₃, as partículas de vaterita é um polimorfo instável em condições ambientais, mas desempenha um papel importante na biomineralização, tornando-se mais interessantes para esta aplicação devido à sua forma esférica, estrutura rica em defeitos e menor solubilidade (HAZEN *et al.*, 2013).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi desenvolvido no Laboratório de Síntese Orgânica localizado no Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba (Univap) e o material utilizado foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP # 2018/18531-6) e pela Univap.

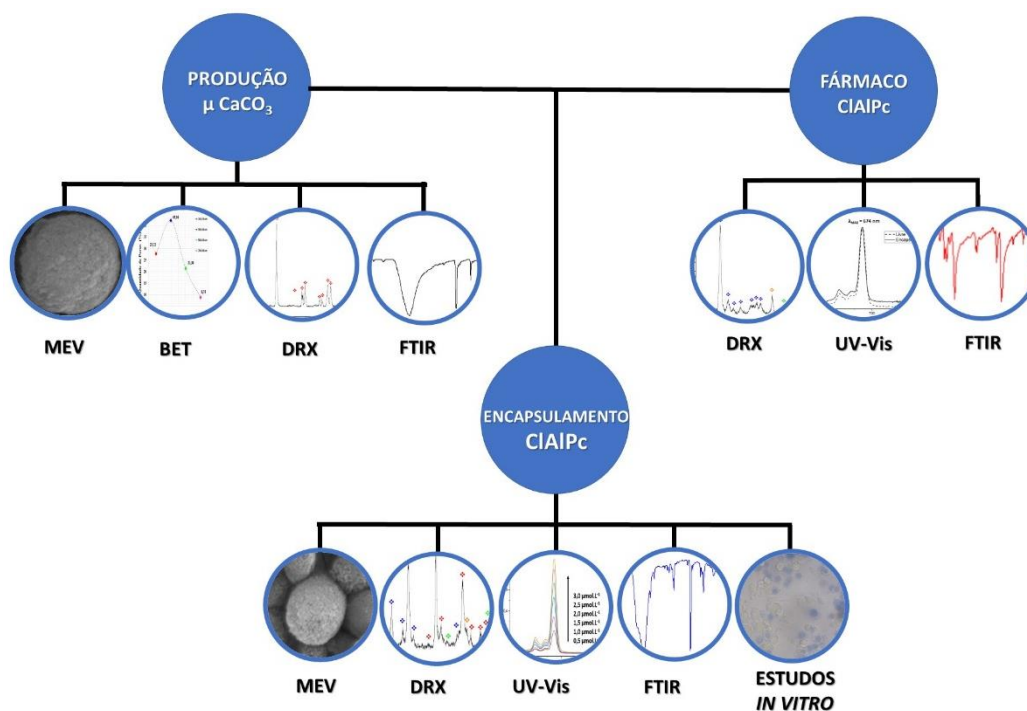
3.1 Materiais

Os reagentes poli (4-estirenosulfonato de sódio) (PSS) e cloro alumínio ftalocianina foram adquiridos da Sigma-Aldrich. Os sais cloreto de cálcio (CaCl_2) e carbonato de sódio (Na_2CO_3) foram adquiridos da Neon. Todos os solventes utilizados foram de grau analítico da marca Synth.

3.2 Métodos

Neste tópico estão descritas as metodologias empregadas para o desenvolvimento do projeto, o fluxograma (Figura 10) mostra as técnicas empregadas em cada etapa.

Figura 10: Fluxograma do desenvolvimento do projeto de pesquisa.

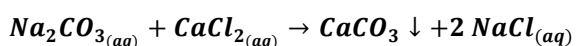


Fonte: Elaborado pela autora.

3.2.1 Produção das micropartículas (μ -CaCO₃)

Os experimentos de precipitação das partículas de carbonato de cálcio foram realizados segundo a metodologia descrita por Saraya e colaboradores (2016), com pequenas modificações. Todo processo experimental baseia-se na precipitação química das partículas de carbonato de cálcio.

A síntese foi baseada na equação química (Equação 1).

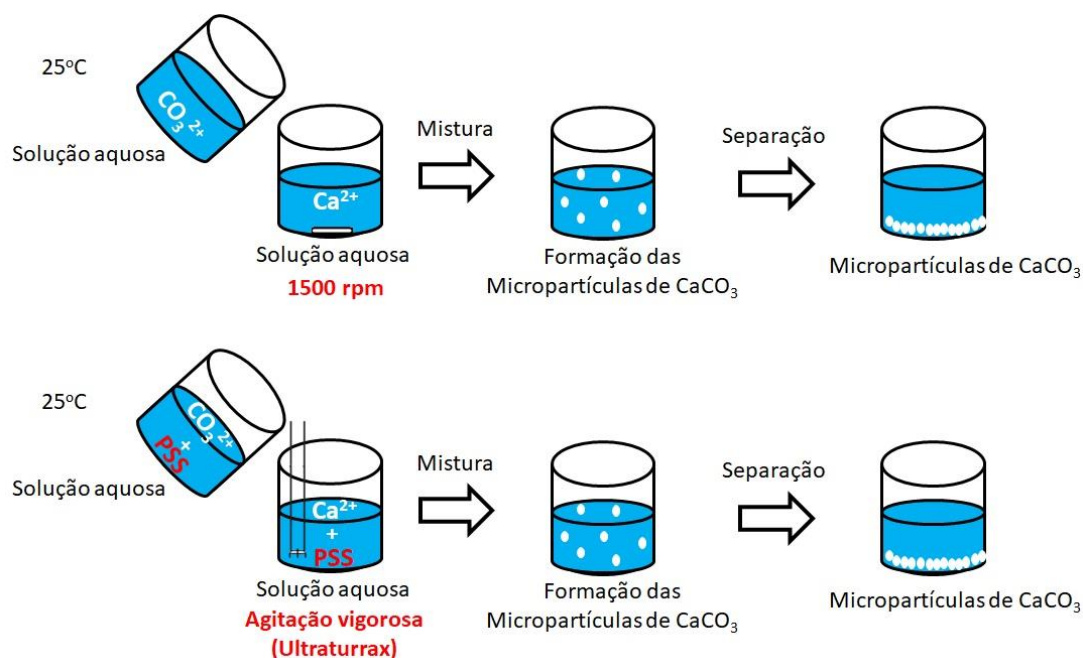


Equação 1

Neste procedimento, foram misturados volumes iguais de soluções aquosas de Na₂CO₃ 1,0 mol.L⁻¹ (pH = 11,2) e 0,5 mol.L⁻¹ CaCl₂ (pH = 6,7) na ausência e presença do surfactante aniônico (2%) PSS (poli 4-estireno sulfonato de sódio) como estabilizante na temperatura de reação de 25 °C sob agitação constante (agitador magnético) (1500 rpm) e (agitação vigorosa) uso do (agitador tipo ultraturax T18) (Figura 11). Foi utilizada água deionizada no preparo de todas as soluções.

Foram controlados os parâmetros na síntese das micropartículas, como supersaturação das soluções, agitação e tempo de reação, buscando as condições ideais para a obtenção das micropartículas esféricas na fase de vaterita (μ -CaCO₃).

Figura 11: Representação esquemática da precipitação química para preparação de micropartículas de CaCO₃.



Fonte: Elaborado pela autora.

Para a incorporação da CIAIPc na formulação, as micropartículas de μ -CaCO₃ foram embebidas em solução de 5 mL de CIAIPc $50\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ em frasco fechado para evitar a evaporação do líquido.

Depois disso, a suspensão foi levada ao equilíbrio sob agitação suave por 24 h. Subsequentemente, μ -CaCO₃ carregadas com CIAIPc (μ -CaCO₃/CIAIPc) foram coletadas por centrifugação, lavadas com etanol PA para remover a CIAIPc adsorvida na superfície externa, e seca em estufa a 50°C para evaporar completamente os solventes residuais.

3.2.2 Caracterização morfológica μ -CaCO₃

A reação foi monitorada nos tempos de 5, 11, 15 e 20 min, após a mistura dos reagentes, por microscopia eletrônica de varredura (MEV) em um equipamento EVO-MA10

(Zeiss-Alemanha) com filamento de tungstênio. Esta técnica foi utilizada para acompanhar o progresso de formação e nucleação das $\mu\text{-CaCO}_3$ e possibilitar a escolha do tempo ideal de reação para a fase de vaterita.

3.2.3 Caracterização por Espectroscopia no Uv-Visível (Uv-vis)

A investigação das propriedades espectroscópicas no estado estacionário do fármaco fotossensível veiculado nas microcápsulas foi baseada em medidas diretas dos espectros de absorção utilizando espectrofotômetro Varian Cary 50 BIO-Varian Inc. Scientific Instruments, Austrália, (IP&D-UNIVAP) á temperatura ambiente.

As micropartículas de $\mu\text{-CaCO}_3$ carregadas com a Ftalocianina foram extraídas em solução de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v) para as análises espectroscópicas.

Estas análises permitiram averiguar se ocorreram alterações no perfil espectral do composto bioativo quando veiculados as $\mu\text{-CaCO}_3$, além de permitir que fosse quantificado o percentual de ativo incorporado no sistema de veiculação, após desenvolvimento da curva padrão de quantificação.

Para estabelecer a linearidade do método proposto, uma curva de calibração foi construída em seis níveis de concentração na faixa de 0,5-3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ por espectroscopia no UV-vis. Nas análises espectrofotométricas, a lei de Beer foi obedecida e a análise de regressão quadrada foi realizada para os dados. Análise unidirecional de variância (ANOVA) e um teste de ajuste ($p = 0,05$) foram utilizados para determinar se o modelo explica adequadamente os dados obtidos.

3.2.4 Caracterização de Fases – Difractometria de Raios X (DRX)

As amostras foram secas a temperatura de 35 °C sob baixo vácuo por 5 dias. A identificação das fases presentes foi obtida em um Difrátômetro de Raios X marca Shimadzu, modelo XRD-6000, em condições normais de temperatura e pressão atmosférica, com *default* com variação de 2θ de 20° à 70°e velocidade de 0,2°/ min.

3.2.5 Caracterização de Tamanhos dos Poros - Brunauer – Emmett– Teller (BET)

As amostras foram secas a temperatura de 35 °C sob baixo vácuo por 5 dias. A área superficial específica das micropartículas foi determinada método Brunauer – Emmett– Teller (BET), Nova220e, Quantachrome, e a distribuição do tamanho dos poros foram definidos usando-se o método de Barrett-Joyner-Halenda (BJH).

3.2.6 Caracterização por Espectroscopia no Infravermelho

Os espectros de absorção no Infravermelho foram obtidos na região de 4000 a 450 cm⁻¹ com resolução de 4 cm⁻¹, no modo transmissão, com 32 varreduras com temperatura controlada em 20 °C. O espectrofotômetro utilizado foi o Spectrum Spotlight 400 com Transformada de Fourier (FT-IR), tecnologia de refletância total atenuada (ATR) da fabricante PerkinElmer.

3.2.7 Determinação da eficiência de encapsulamento (EE)

A Eficiência de Encapsulamento (%EE) das μ -CaCO₃/CIAIPc foi obtida através de um pequeno experimento, onde 1,6 mL de CIAIPc 0,1 mg.mL⁻¹ foi absorvido por 10 mL de solução μ -CaCO₃ por 48 horas, ambas em álcool etílico PA. Após a absorção o produto foi liofilizado, colocado em 50 mL de solução alcoólica de Dimetilsulfóxido (DMSO) (10%, v/v) para extrair o fármaco encapsulado e analisado utilizando um espectrofotômetro (Cary 50 BIO-Varian Inc. Scientific Instruments). De acordo com estudos de Andrade (2008), com os dados obtidos da análise espectrofotométrica, pela Lei de Lambert-Beer, foi obtida a massa responsável pela absorção encontrada e com ela calculada a %EE utilizando a fórmula (Equação 2) (LI *et al.*, 1997).

$$\%EE = \left(\frac{M_{atual}}{M_{teórica}} \right) \cdot 100$$

Equação 2

onde M_{atual} é a massa encapsulada nas μ -CaCO₃ calculada pela Lei de Lambert-Beer através do gráfico de absorção e $M_{teórica}$ é a massa teórica colocada inicialmente para ser encapsulada nas μ -CaCO₃.

3.2.8 Cultura da cepa de RAW 264.7

A linhagem de macrófagos, foram mantidas em meio Dulbecco modification of Minimum Essential Media (DMEM) suplementado com 10% Soro Fetal Bovino, 1% de solução de Penicilina/Estreptomicina, acondicionados em estufa de cultura a 37 °C com 5% de CO₂. O meio é trocado a cada dois dias ou de acordo com a metabolização da célula.

3.2.9 Estudos de citotoxicidade e fototoxicidade

Para os ensaios de citotoxicidade e fototoxicidade foram utilizados um volume de 1×10^5 células/mL por poço, em cada grupo testado. As células foram incubadas com a ftalocianina diluída em solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS), nas concentrações de 0,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, por um período de uma hora, em estufa à 37 °C, ao abrigo da luz. Depois o fotossensibilizador foi retirado, e adicionado meio Dulbecco modification of Minimum Essential Media (DMEM) fresco, sem fenoltaleína. O grupo escuro foi mantido em estufa, e o grupo irradiado foi submetido à irradiação, utilizando uma Biotable (Biopdi/Irrad-Led) constituída de 48 lâmpadas de LEDs, no comprimento de onda de 660nm, 25mW.cm⁻², nas doses de 5 J.cm⁻² e 10 J.cm⁻².

3.2.10 Internalização da Ftalocianina

A linhagem de macrófagos RAW 264.7 foram aderidas em lamínulas redondas, na concentração de 1×10^5 células, em placas de 24 poços, e mantidas em estufa à 37 °C e 5% de CO₂ ambiente, *overnight* em meio DMEM. Após a adesão, o meio foi retirado e foi adicionado a Ftalocianina, nas concentrações de 0,6 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e mantidas à 37 °C, por uma hora. A ftalocianina foi retirada, as amostras lavadas com solução salina tamponada com fosfato de sódio (PBS) por duas vezes. As lamínulas foram retiradas da placa e montadas com o meio de montagem ProLong™ Gold Antifade Mountant (Invitrogen™). Todo o processamento foi realizado no escuro, e as lâminas foram examinadas em microscópio confocal de varredura a laser LSM 700 marca Carl Zeiss.

3.2.11 Avaliação da viabilidade celular

O ensaio de exclusão por Azul de Tripán é um método utilizado para avaliar a citotoxicidade e a fototoxicidade onde é mensurando a viabilidade celular pela integridade da membrana celular. Baseia-se no fato que as células mortas absorvem o Azul de Tripán para seu citoplasma por perda de seletividade da membrana.

Para a avaliação da viabilidade foi utilizado o método de exclusão por Azul de Tripán. Esse teste permite separar células vivas de mortas, pois células viáveis não permitem a entrada do corante, já as células mortas ficam coradas em azul e as incolores vivas. Trata-se de um método eficaz, pois o método é barato e o rompimento da membrana plasmática é um fato que determina a morte celular.

Após os ensaios de cito e fototoxicidade, após um período de 24 horas, o meio foi retirado e adicionado o Azul de Tripán na concentração de 0,2%, e incubado por 5 minutos. Após esse período, o Tripán foi retirado e foi adicionado PBS, e os grupos foram analisados em microscópio invertido, onde foram capturadas imagens das células. Para cada grupo foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios. As células vivas e mortas foram analisadas utilizando o *software ImageJ*. Os ensaios foram realizados em triplicatas em três ensaios separados e a porcentagem de células vivas foi obtida pela Equação 3.

$$\% \text{ Viabilidade} = \frac{(\text{Total de células vivas}) \cdot 100}{(\text{Total de células contadas})}$$

Equação 3

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos nos ensaios realizados durante o desenvolvimento do projeto estão apresentados neste capítulo, assim como as observações e discussões geradas pelas análises.

4.1 Caracterização Morfológica das μ -CaCO₃

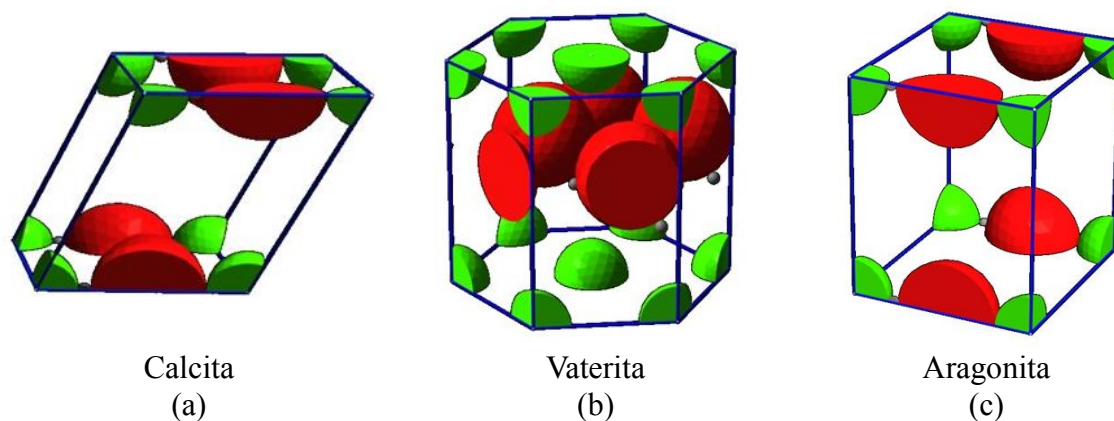
A calcita, a vaterita e a aragonita são diferentes em suas características cristalográficas (Figura 12). Mas eles são compostos de íons cálcio e íons carbonato. Sua diferença está na localização dos íons nos cristais, que é formada durante a cristalização. Em uma condição normal, os três tipos de cristais crescem simultaneamente. Com a mudança da condição externa, o equilíbrio da competição muda, resultando em um aumento de uma fase e uma diminuição de outra fase (RODRIGUEZ-NAVARRO; ELERT; SEVCIK, 2016).

O crescimento da calcita é largamente dependente da força de uma solução (TAI; CHIEN; CHEN, 1999). A vaterita cresce como partículas agregadas de pequenas partículas de vaterita. A agregação é principalmente dependente da densidade dos núcleos da vaterita, que é determinada pela supersaturação, bem como pela transformação da vaterita em calcita e aragonita. A aragonita cresce através de uma fixação orientada de pequenas partículas de aragonita (KIRBOGA; ONER, 2013).

A formação de polimorfos cristalinos de carbonato de cálcio (calcita, vaterita e aragonita) durante a biomineralização ocorre frequentemente através de um precursor nanoparticulado de Carbono de Cálcio Amorfo (ACC) (WEINER; SAGI; ADDADI, 2005). A cristalização do ACC em calcita permite que os organismos se formem biominerais com morfologias complexas e cristais com orientações cristalográficas definidas.

Todas as combinações de parâmetros aplicados na produção das micropartículas de CaCO₃ resultaram em supersaturação. Composto CaCO₃ amorfo (ACC) com alta instabilidade cristaliza-se em três diferentes polimorfos, calcita (Figura 12a), vaterita (Figura 12b) e aragonita (Figura 12c).

Figura 12: Células unitárias das fases polimórficas do CaCO_3 . a) calcita, b) vaterita, c) aragonita.



Fonte: Elaborado pela autora.

Sendo a fase calcita a mais estável, possuindo estrutura cristalina do tipo triclinica favorece a formação de partículas prismáticas (FIONA; HELMUT, 2008). Já as fases vaterita e aragonita são metaestáveis, sendo encontradas no início da cristalização do CaCO_3 . A transformação de fase ocorre devido à variações de temperatura e/ou pressão do sistema de fechado de produção (RADHA; NAVROTSKY, 2013).

A fase vaterita, possui estrutura cristalina do tipo hexagonal, enquanto a fase aragonita possui estrutura ortorrômbica. Ambas as fases competem no processo de nucleação e crescimento, sendo que a agitação vigorosa ativa a cristalização no sistema hexagonal, produzindo partículas esféricas de vaterita. Com o aumento da temperatura, acima de $40\text{ }^\circ\text{C}$ e na ausência de agitação, é favorecida a formação dos cristais aciculares de aragonita (COSTA; OLYVEIRA; SALOMÃO, 2017).

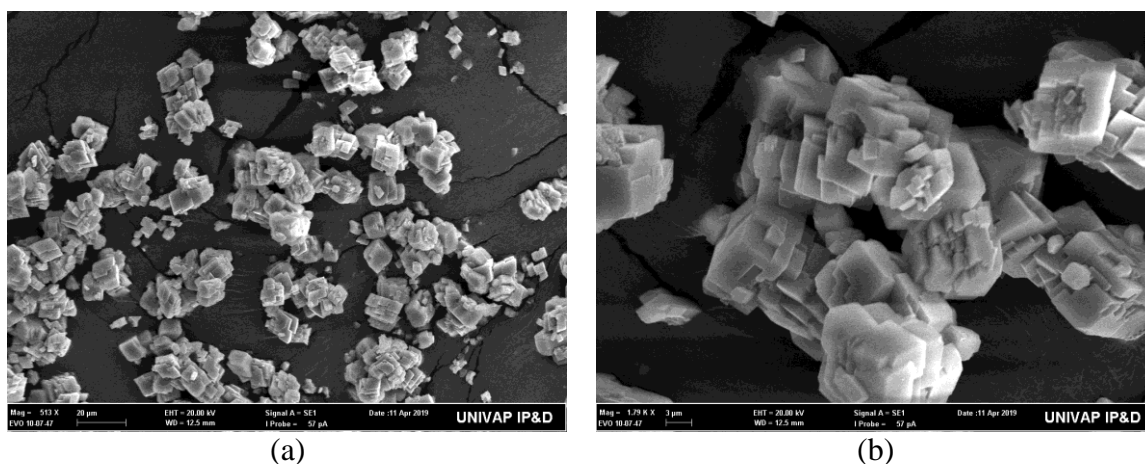
A vaterita é a fase menos densa e sua taxa de nucleação é mais rápida que a da calcita. Mas os núcleos da vaterita não são termodinamicamente estáveis, dissolvendo-se na solução para precipitar como calcita. No entanto, em alta supersaturação e agitação vigorosa, a dissolução da vaterita diminui e leva à formação de partículas esféricas metaestáveis de agregados de vaterita (HAN *et al.*, 2006). Assim, o experimento de mistura direta com alta supersaturação leva à formação maciça de vaterita esférica (MORSE; ARVIDSON; LUTTGE, 2007).

Para a obtenção da fase vaterita, a produção foi realizada de modo a controlar a transformação do ACC na fase cristalina desejada (RADHA; NAVROTSKY, 2013) estrutura a qual foi formado imediatamente após a mistura das soluções.

A Figura 13a mostra as imagens das micropartículas de CaCO_3 formadas na ausência de PSS e sob agitação de 1500 rpm. Os resultados mostram que, na ausência do PSS e com agitação magnética, a fase polimórfica do CaCO_3 formada trata-se de cristais prismáticos de calcita, sendo esta evidência suficiente para a caracterização destas partículas, não necessitando da realização de caracterização por difratometria de raios X.

Nesta imagem observa-se a característica angular das extremidades dos cristais formados (Figura 13b) com superfícies lisas e isentas de poros. Devido a esta característica, os cristais de calcita não são atraentes para a aplicação como sistema de liberação controlada de fármacos.

Figura 13: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de CaCO_3 na ausência de PSS e agitação de 1500 rpm.



Fonte: Elaborado pela autora.

Por outro lado, o processamento realizado com a adição PSS como estabilizante e aplicação de vigorosa agitação através do agitador tipo (Ultraturrax) permitiu a cristalização da fase almejada, vaterita, pois ambos os parâmetros têm efeito no crescimento dos cristais. O PSS age como um estabilizador de fases permitindo a obtenção das microesferas de vaterita. Já a agitação vigorosa proporciona um cisalhamento na solução favorecendo a nucleação e o crescimento de partículas esféricas com estrutura hexagonal.

Porém, em estudo realizado para a otimização da produção desta fase, observou-se que o tempo de reação influencia nas características do composto formado, sendo este, assim, o terceiro fator a ser controlado no processo.

Para a realização deste estudo, alíquotas em tempos determinados foram retiradas e analisadas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), cabe salientar que neste processo

de análise, as amostras coletadas nas alíquotas não foram submetidas à lavagem e extração do estabilizador de fase.

Como mostrado na (Figura 14a), e a morfologia esférica da vaterita é formada já nos primeiros 5 minutos de reação, de forma discreta com a formação de poucos núcleos de cristalização identificados pelas setas.

Após 11 minutos de reação, observa-se uma maior densidade de núcleos crescidos da vaterita (Figura 14b), observa-se que os cristais formados estão envoltos em um filme polimérico proveniente do estabilizador de fase (PSS) marcado pela seta.

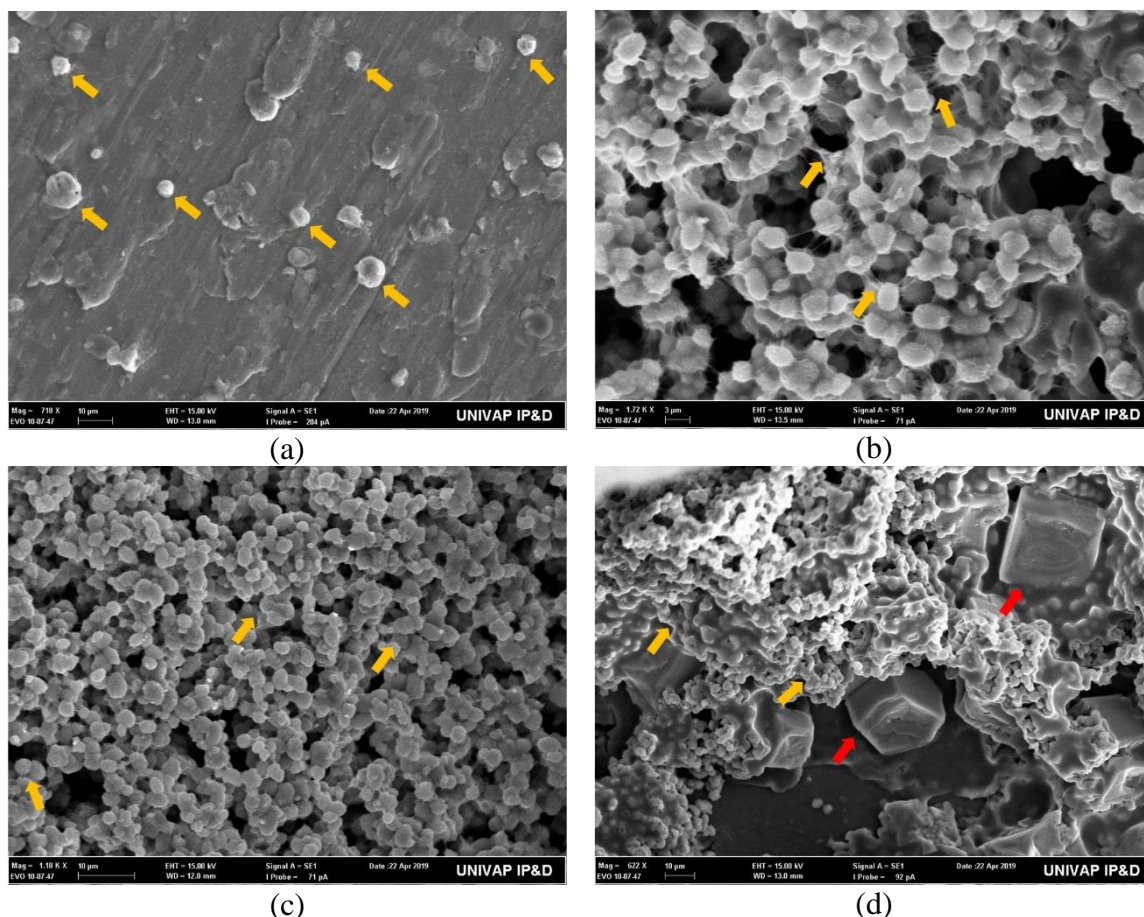
Com a análise do tempo de reação de 15 minutos, (Figura 14c) observa-se o crescimento anormal dos cristais, marcados pelas setas, isto indica que neste estágio de reação o processo de nucleação que ocorre, inicialmente, concomitante ao crescimento dos cristais, foi concluído, sendo o processo de crescimento dos cristais o único a ocorrer. Nesta fase, poucas são as partículas que apresentam a presença do filme polimérico depositado na superfície das partículas, fator adicional que indica que sua eficiência não é satisfatória em tempos superiores a 15 minutos de reação.

Efeito do crescimento dos cristais é claramente observado aos 20 minutos de reação minutos (Figura 14d), onde observa-se, o coalescimento das partículas esféricas, caracterizado pela união das partículas com a formação de um pescoço proveniente do processo de difusão no estado sólido (setas amarelas) e o aparecimento de cristais prismáticos característicos da fase calcita (setas vermelhas).

Como o processo foi realizado em temperatura ambiente e sob agitação vigorosa, não foi favorecida a formação da fase aragonita.

Com a realização do estudo avaliando o tempo de reação, foram determinados os parâmetros de produção da fase vaterita a partir de soluções aquosas de íons de Ca^{2+} e $(\text{CO}_3)^{2-}$. Além da aplicação de agitação vigorosa após a mistura das soluções de íons, é necessário a adição de um estabilizador de fase e a controle e manutenção da temperatura, é imprescindível o controle do tempo de reação para garantir tanto a eficiência do estabilizador de fase quanto a garantia da coexistência dos processos de nucleação e crescimento dos cristais.

Figura 14: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das micropartículas de CaCO_3 na presença de PSS e agitação vigorosa com ultraturrax: a) 5 min; b) 11 min, c) 15 min, d) 20 min após a mistura dos reagentes.

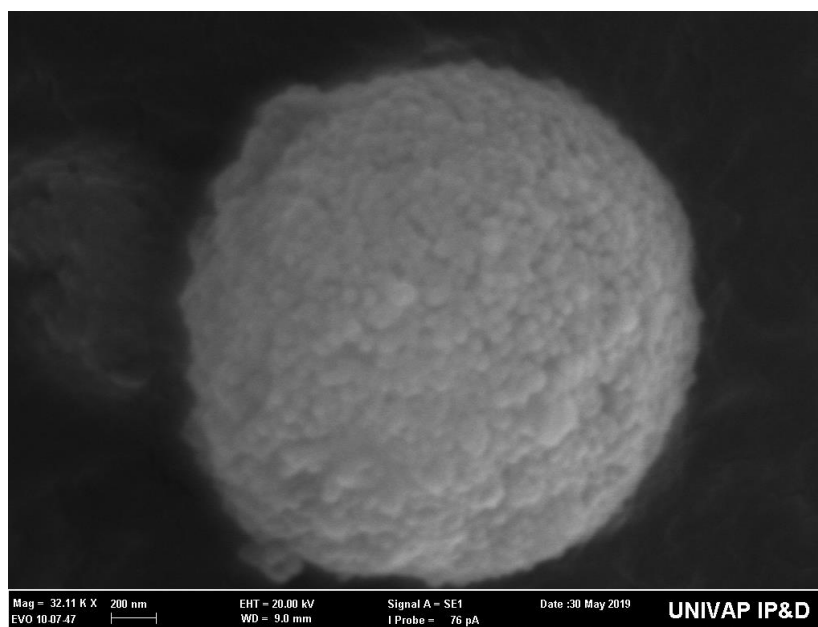


Fonte: Elaborado pela autora.

Como dito anteriormente o PSS desempenha um papel muito importante na preparação de vaterita. Pode-se observar que, na presença de superplastificante do tipo policarboxilato (PPS), ocorrem polimorfos de vaterita e calcita, enquanto na ausência de superplastificante do tipo policarboxilato, a calcita é a única forma cristalina. Isto é principalmente devido ao polímero implicando a inibição do crescimento dos núcleos cristalizados e uma redução da cristalinidade e da instabilidade. Assim, o PSS na concentração de 2% neste sistema leva à estrutura da vaterita que permanece estável por tempo prolongado (SARAYA; ROKBAA, 2016). Os resultados indicam que o PSS favorece a formação de vaterita, o que está de acordo com os resultados obtidos no experimento de cristalização de reação rápida realizado à temperatura ambiente.

A imagem de MEV (Figura 15) de uma partícula de carbonato na fase de vaterita após 11 minutos de reação mostrou a existência de pequenos poros, existentes em abundância na superfície rugosa da micropartículas de CaCO_3 .

Figura 15: Detalhe da morfologia da superfície da micropartícula porosa de CaCO_3 .



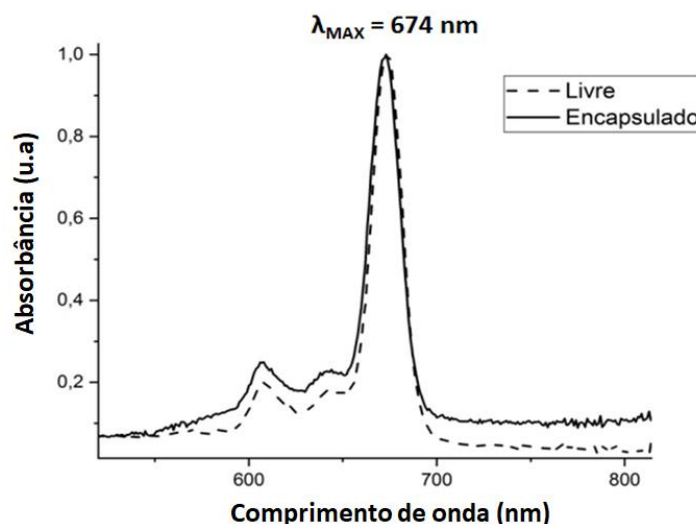
Fonte: Elaborado pela autora.

A alta área superficial específica e a porosidade das partículas de vaterita são de importância particular para suas aplicações práticas, pois são por meio dos nanoporos presentes na superfície das micropartículas que se torna possível a inclusão de bioativos nestes sistemas (WANG *et al.*, 2006), os quais se apresentam como uma nova categoria para a entrega de fármacos de maneira sítio-específica podendo ser aplicados em protocolos de TFD.

4.2 Estudo das propriedades fotofísicas no estado estacionário

A avaliação das $\mu\text{-CaCO}_3/\text{ClAlPc}$ apresentaram forte banda de absorção na região do vermelho com máximo de absorção localizado em 674 nm. Estes resultados foram comparados com a ClAlPc na sua forma livre, ou seja, quando não associada a um sistema de liberação controlada (Figura 16), mostrando perfil característico de uma espécie não agregada na faixa de concentração estudada.

Figura 16: Espectro de absorção no Uv-vis da ClAlPc livre (etanol) e encapsulada em μ - CaCO_3 .



Fonte: Elaborado pela autora.

A análise da espectroscopia de absorção permitiu verificar que a incorporação do fármaco fotossensível nesse sistema de liberação não afetou o espectro de absorção do composto, fator que deve ser levado em consideração, uma vez que um sistema de liberação ideal deve manter as propriedades físico-químicas do composto original (OCHSNER, 1997; SCHAFFAZICK *et al.*, 2003).

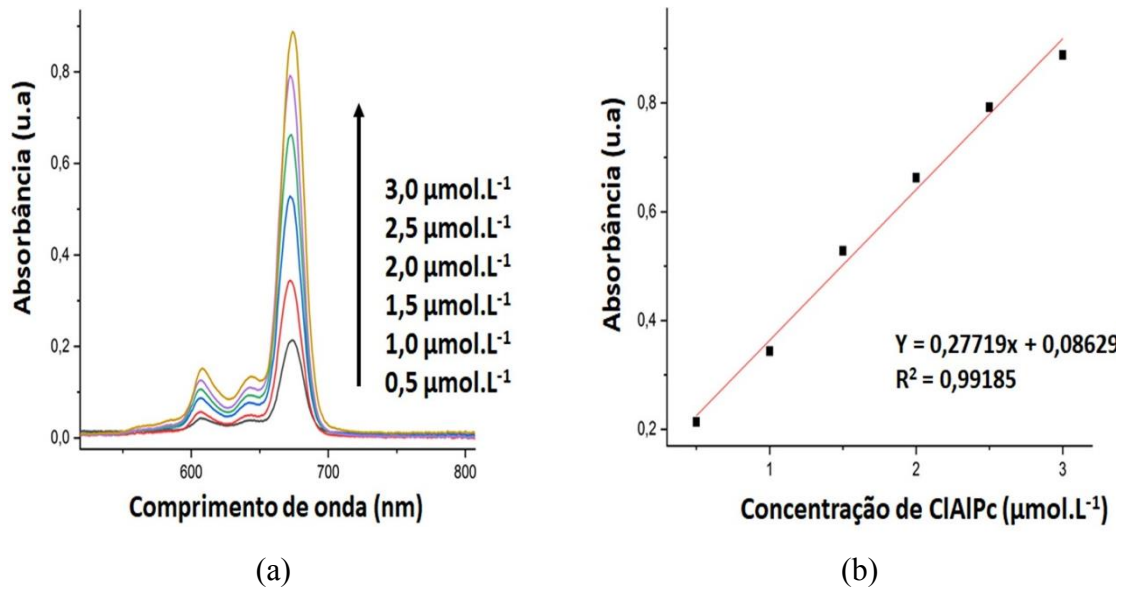
O espectro de absorbância mostrou que a incorporação do FS nas micropartículas de carbonato de cálcio não alterou o perfil espectral do composto uma vez que um sistema de liberação ideal deve manter as propriedades físico-químicas do fotossensibilizador (CAMERIN *et al.*, 2010).

Os agregados em solução exibem alterações distintas na banda de absorção em comparação às espécies monoméricas. A não observação de uma mudança na banda Q sugere que o FS está principalmente na forma de monômero quando incorporado micropartículas de carbonato de cálcio fotossensíveis, uma condição desejável e eficaz para um FS em TFD. Estudos espectroscópicos realizados em ftalocianinas incorporadas em sistemas micro e nanoparticulados, comparados ao seu comportamento em solventes, também mostraram a capacidade destes sistemas melhorar o estado monomérico das ftalocianinas (MESQUITA *et al.*, 2018).

A linearidade de um método analítico pode ser definida como a capacidade de obter resultados diretamente proporcionais à concentração do analito (CHAUHAN; MITTU;

CHAUHAN, 2015). Análises de regressão linear foram realizadas plotando a intensidade da absorvância *versus* a concentração de CIAIPc ($\mu\text{mol.L}^{-1}$).

Figura 17: (a): Espectros de absorção de CIAIPc em diferentes concentrações; (b): gráfico da concentração de CIAIPc vs. Absorbância.



Fonte: Elaborado pela autora.

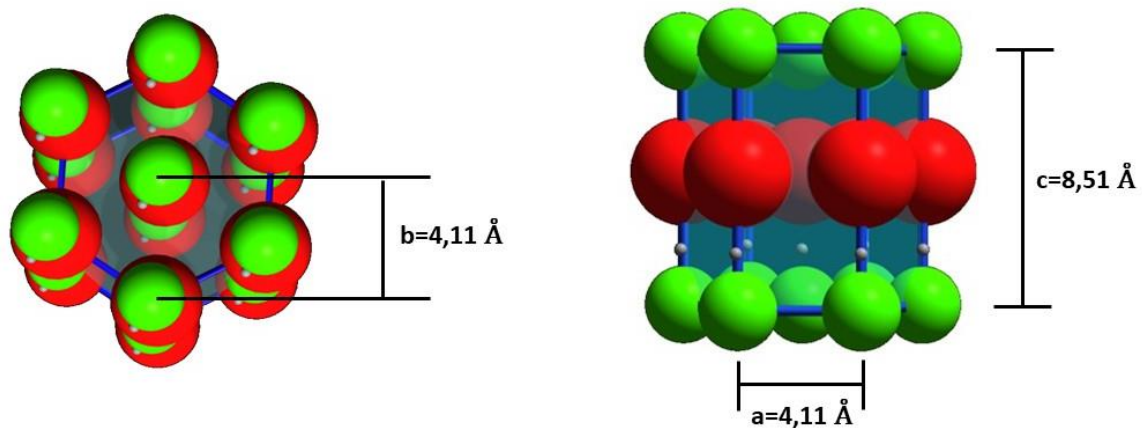
Linearidade satisfatória foi detectada pelo método espectrofotométrico na faixa de concentração de 0,5-3,0 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (Figura 17a). A regressão pelo mínimo quadrado para o método espectrofotométrico apresentou excelente coeficiente de correlação ($r = 0,99185$) e a equação linear foi: $\text{absorbância} = 0,27719[\text{CIAIPc, concentração em } \mu\text{mol.L}^{-1}] + 0,08629$ (Figura 17b).

Foram obtidos rendimentos satisfatórios e eficiência de encapsulação nas micropartículas de CaCO_3 (rendimento = $78 \% \pm 0,8$ e EE = $83,8 \% \pm 1,1$). Svenskaya e colaboradores (2014) desenvolveram micropartículas de carbonato de cálcio contendo o fotossensibilizador Photosens e encontraram uma eficiência de encapsulamento nos nanoporos de $2,0 \pm 0,2\%$ em peso, que concorda com os dados da literatura sobre a encapsulamento de compostos bioativos em micropartículas de CaCO_3 .

4.3 Difractometria de Raios X (DRX)

Observa-se somente a presença da fase vaterita que foi identificada pela ficha JCPDS-ICDD número 00-002-0261; que descreve a referida fase com estrutura cristalina do tipo hexagonal com parâmetros de rede $a=b=4,11 \text{ \AA}$ e $c=8,51 \text{ \AA}$ (Figura 18); e uma densidade teórica de $2,54 \text{ g/cm}^3$ o que corrobora com o reportado pela literatura (FIONA; HELMUT, 2008).

Figura 18: Esquema em escala da Célula Unitária Vaterita. Esferas vermelhas: Oxigênio, esferas verdes: cálcio e esferas cinza: carbono.



Fonte: Elaborado pela autora.

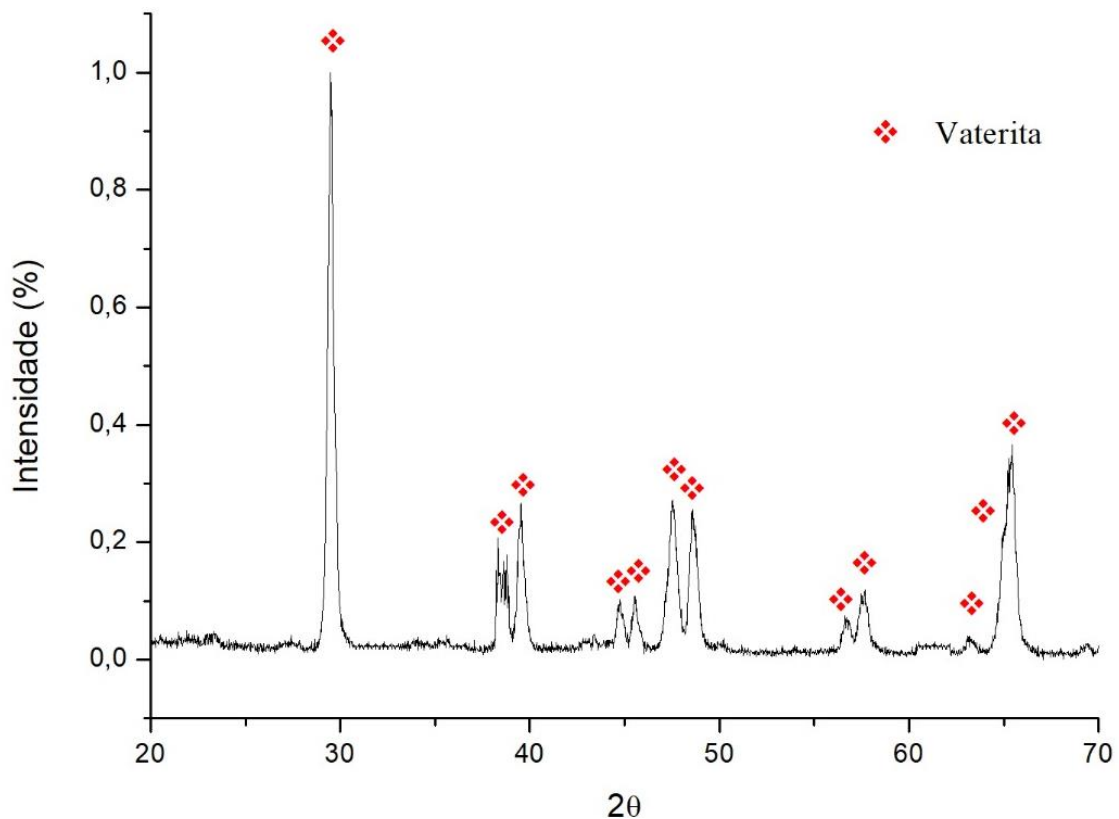
Seus picos mais intensos localizam-se em $2\theta = 33,027^\circ$, $43,917^\circ$ e $49,498^\circ$ referentes à difração dos raios X nos planos, respectivamente, $(1\ 0\ 2)$, $(1\ 1\ 0)$ e $(1\ 1\ 2)$.

Este resultado comprova a formação de micropartículas de vaterita conforme observado nas análises morfológicas apresentadas no subtópico 4.1.

O difratograma de raios X (DRX) apresentado na (

Figura 19) mostra a fase obtida no processo de síntese das micropartículas no tempo de 11 minutos a temperatura ambiente sob agitação vigorosa.

Figura 19: Difratoograma de Raios X das micropartículas de carbonato de cálcio sintetizadas por precipitação química.



Fonte: Elaborado pela autora.

A fase esperada foi formada, porém foi necessária a secagem controlada a temperatura de 35 °C do composto por 5 dias sob vácuo para a realização da análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) e a análise da composição das fases por difratometria de raios X (DRX).

A vaterita é metaestável tendo sua transformação ativada em temperaturas superiores a 40 °C (CHONG; SHEIKHOESLAMI 2001; XIANG *et al.*, 2002) deste modo é necessário o controle da temperatura de secagem.

Esta morfologia é característica da fase vaterita, enquanto as fases aragonita e calcita formam cristais angulados. Estes cristais não foram encontrados nas regiões analisadas por

microscopia eletrônica de varredura, e corroborado com os resultados obtidos pela análise por difratometria de raios X.

O fotossensibilizador empregado neste projeto trata-se de Cloro Alumínio Ftalocianina, este composto foi analisado por difratometria de raios X para que fosse possível a comparação entre as micropartículas de vaterita livres e encapsuladas.

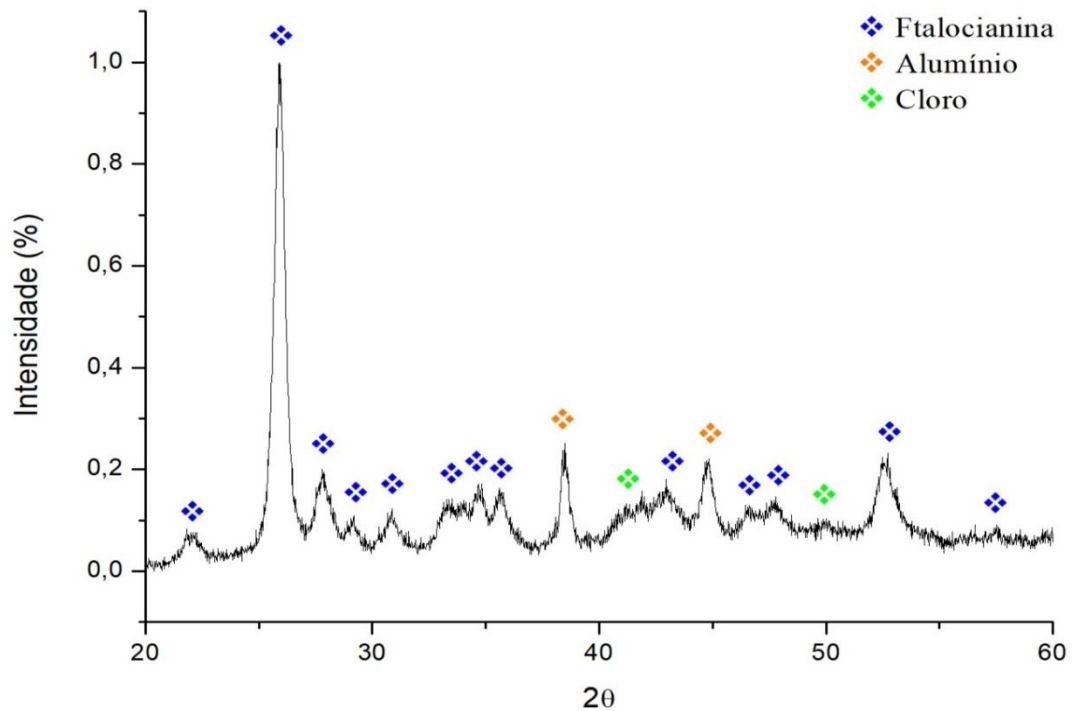
Como esperado de um composto comercial puro, encontraram-se as fases cristalinas do macrociclo da ftalocianina, identificada pela ficha JCPDS-ICDD número 00-002-0312; que descreve a referida fase com estrutura cristalina do tipo monoclínica com parâmetros de rede $a=17,31 \text{ \AA}$ $b=4,72 \text{ \AA}$ e $c=14,00 \text{ \AA}$. Seus picos mais intensos localizam-se em $2\theta=23,205^\circ$, $25,803^\circ$ e $27,421^\circ$ referentes à difração dos raios X nos planos, respectivamente, $(2\ 1\ 1)$, $(\bar{3}\ 1\ 2)$ e $(3\ 0\ 3)$.

Ademais, foram identificadas as presenças dos metais inseridos no macrociclo para a formação da Cloro Alumínio Ftalocianina (Figura 20).

O alumínio foi identificado pela ficha JCPDS-ICDD número 01-089-2837 que descreve a referida fase com estrutura cristalina do tipo cúbica com parâmetros de rede $a=b=c=4,059 \text{ \AA}$. Os picos identificados localizam-se em $2\theta=38,377^\circ$ e $44,609^\circ$ referentes à difração dos raios X nos planos, respectivamente, $(1\ 1\ 1)$ e $(2\ 2\ 0)$.

O cloro foi identificado pela ficha JCPDS-ICDD número 01-084-0799 que descreve a referida fase com estrutura cristalina do tipo ortorrômbica com parâmetros de rede $a=6,180 \text{ \AA}$ $b=4,417 \text{ \AA}$ e $c=8,171 \text{ \AA}$. Os picos identificados localizam-se em $2\theta=50,074^\circ$ e $42,357^\circ$ referentes à difração dos raios X nos planos, respectivamente, $(3\ 1\ 1)$ e $(0\ 2\ 1)$.

Figura 20: Difratograma de Raios X da Cloro Alumínio Ftalocianina.



Fonte: Elaborado pela autora.

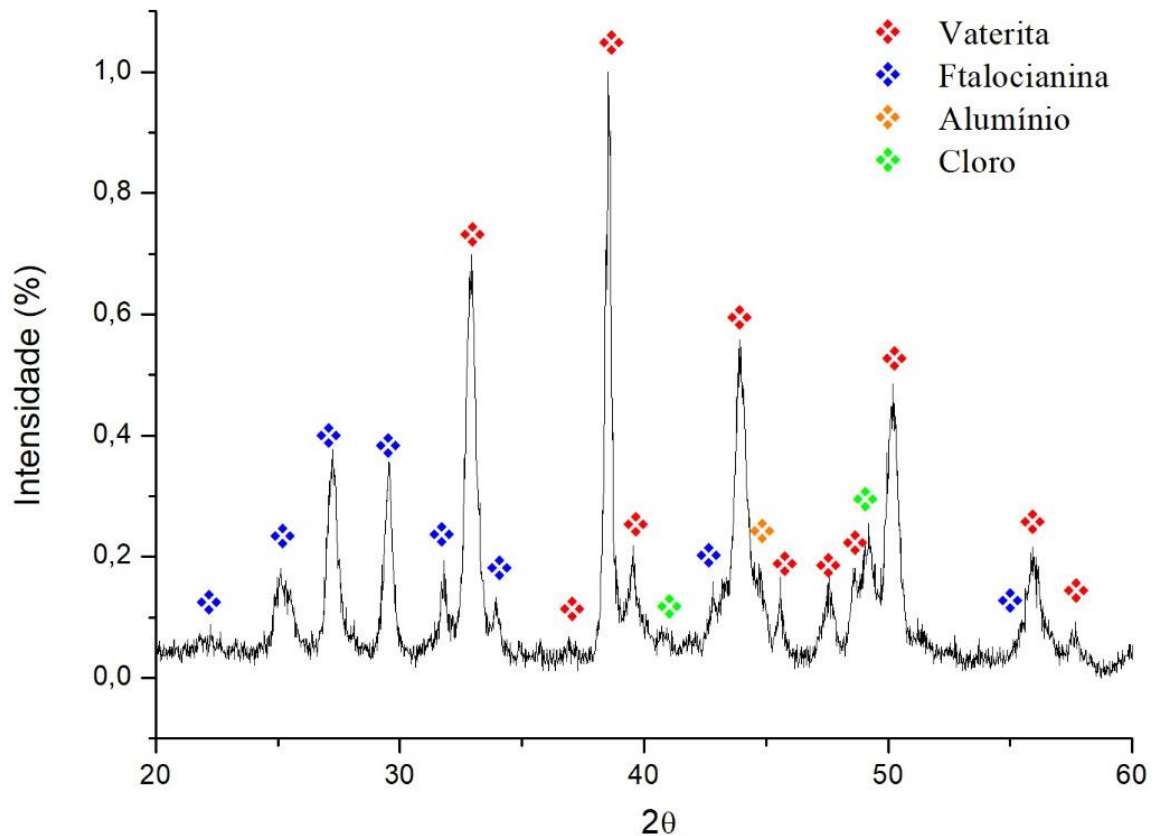
A análise do difratometria de raios X das micropartículas de vaterita encapsuladas com cloro alumínio ftalocianinas (

Figura 21) comprovam que as moléculas do fotossensibilizador estão adsorvidas nos poros das micropartículas, visto que observou-se o deslocamento dos picos de vaterita que apresentaram aproximadamente $0,02^\circ$ de aumento no ângulo de difração.

Este deslocamento é resultado da interação física entre os compostos, sendo que a presença do fotossensibilizador influenciou o fenômeno de difração dos raios X incidentes na amostra de vaterita.

Este resultado corrobora com o obtido no ensaio por Espectroscopia no Infravermelho que será discutido o tópico 4.5.

Figura 21: Difratograma de Raios X das micropartículas de vaterita encapsuladas com Cloro Alumínio Ftalocianina.



Fonte: Elaborado pela autora.

A técnica de análise por difração dos raios X utilizada não possibilita a quantificação das fases presentes, mas a intensidade dos picos obtidos pode remeter arbitrariamente à quantidade das fases presentes. Deste modo, pode-se comprovar maior concentração da fase vaterita quando comparada às fases formadoras do fotossensibilizador.

4.4 Caracterização de Tamanhos dos Poros - Brunauer – Emmett– Teller (BET)

As micropartículas de vaterita obtidas no processo de precipitação química analisadas por microscopia eletrônica de varredura apresentaram superfícies porosas, o que é uma interessante característica para sistemas de liberação controlada de fármacos, visto que nestes poros serem adsorvidos o fotossensibilizador.

O conhecimento da distribuição de tamanhos dos poros é importante para averiguar a possibilidade de encapsulamento destes compostos no composto carreador.

A distribuição dos tamanhos de poros obtido pelo método BET resultou em 4 faixas de tamanhos de poros, (Tabela 1), resultando em um tamanho médio de poros de 37,21 nm.

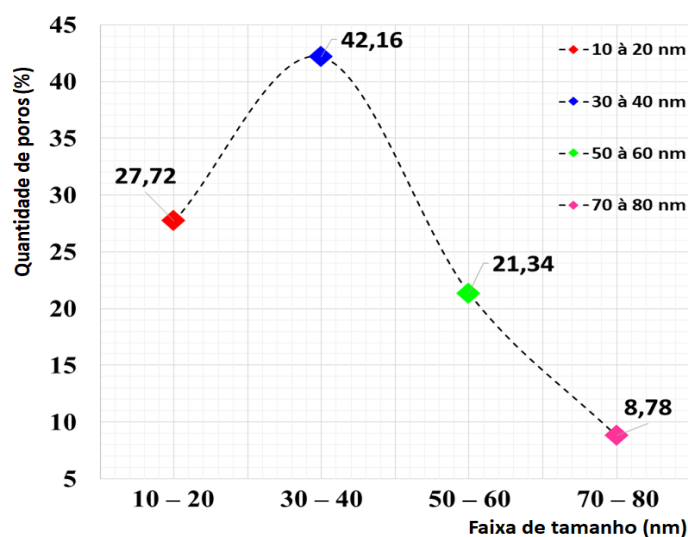
Tabela 1: Dados obtidos para caracterização do tamanho dos poros das micropartículas de vaterita

Faixa de Tamanho de Poros (nm)	Quantidade de Poros (%)
10 à 20	27,72
30 à 40	42,16
50 à 60	21,34
70 à 80	8,780

Fonte: Elaborado pela autora.

A partir dos dados apresentados (Tabela 1) plotou-se um diagrama de distribuição de tamanho de poros (Figura 22) onde está apresentada a curva nota-se que em uma distribuição monomodal do tamanho dos poros das micropartículas de vaterita estando a maior quantidade de poros na faixa de 30 à 40 nm de diâmetro.

Figura 22: Distribuição de tamanho de Poros das micropartículas de vaterita.



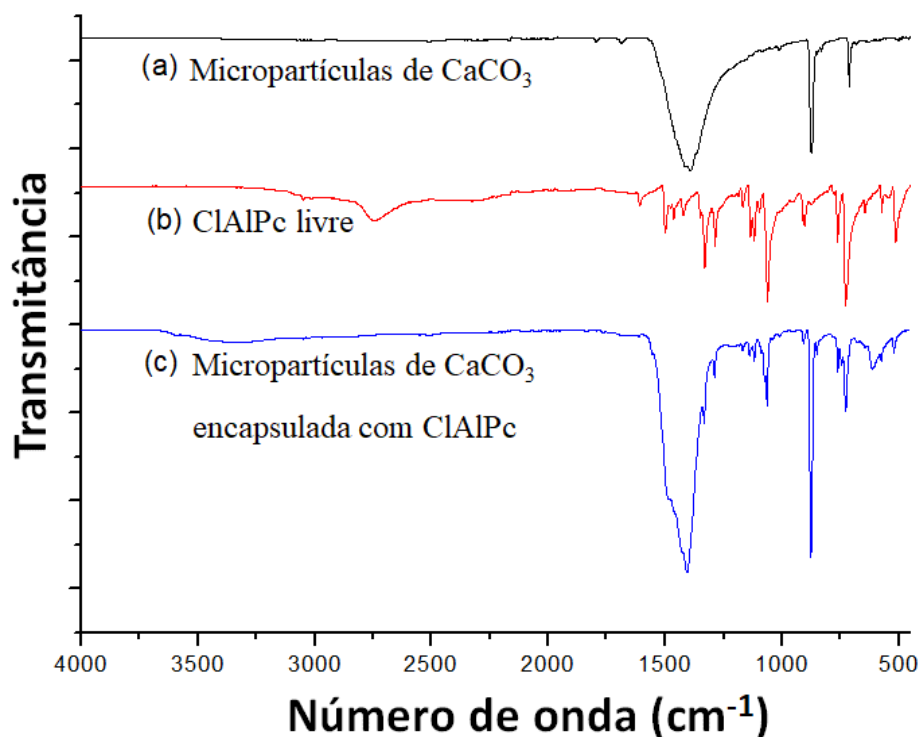
Fonte: Elaborado pela autora.

4.5 Espectroscopia no Infravermelho (IV)

A técnica de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier foi utilizada para avaliar o encapsulamento do bioativo no sistema de liberação.

Os espectros de IV das micropartículas de CaCO_3 , ClAlPc livre e as micropartículas de CaCO_3 carregadas com ClAlPc são mostradas na (Figura 23).

Figura 23: Espectros de FTIR das micropartículas de CaCO_3



Fonte: Elaborado pela autora.

O espectro das micropartículas de CaCO_3 carregadas com CIAIPc reflete bandas de absorção características do FS e carbonato de cálcio sem novas bandas óbvias, o que indica que a adsorção de CIAIPc no CaCO_3 é de natureza física (WANG *et al.*, 2006) observaram comportamento semelhante quando realizaram o encapsulamento de ibuprofeno em micropartículas porosas de CaCO_3 .

Apresentando pico de CaCO_3 por volta de 870 cm^{-1} ; deformação angular fora do plano CO_3 ; banda por volta de 1480 : estiramento antissimétrico de ligações C -O por volta de 710 cm^{-1} : deformação angular no plano O-C-O.

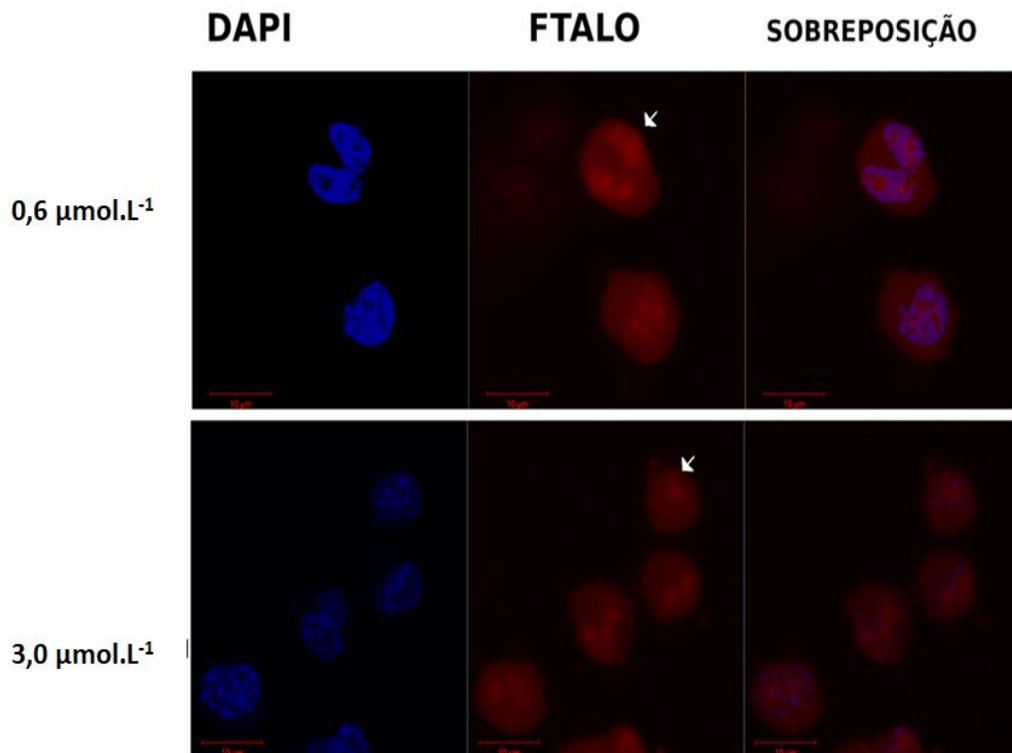
4.6. Internalização da Ftalocianina

A Figura 24 apresenta os resultados da internalização do fotossensibilizador pelo macrófago nas diferentes concentrações utilizadas. As imagens foram capturadas em Microscópio Confocal Zeiss (LSM 700), em objetiva Plan-Apochromat 63x, com a qual foram capturadas 85 slices, para compor as imagens finais. O marcador 4',6'-diamino-2-fenil-

indol (DAPI) foi excitado com laser em comprimento de onda de 405 nm e a ftalocianina em 555 nm.

O marcador DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) é utilizado para marcar DNA celular, indicando o núcleo, em azul. A fluorescência da ftalocianina é indicada nas imagens do meio, em vermelho, e a sobreposição dos canais é apresentada à direita. O DAPI foi excitado em 405 nm e a ftalo em 555 nm. A seta indica a concentração de ftalo no núcleo.

Figura 24: Internalização da ftalocianina por macrófagos, nas concentrações de $0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, após 1 hora de incubação à 37°C .



Fonte: Elaborado pela autora.

É possível observar a internalização da ftalocianina após uma hora de incubação, à 37°C , com o FS distribuído no citoplasma, em ambas as concentrações testadas. Observa-se também a concentração de ftalocianina em região correspondente ao núcleo, sobrepondo o sinal com o material nuclear (seta).

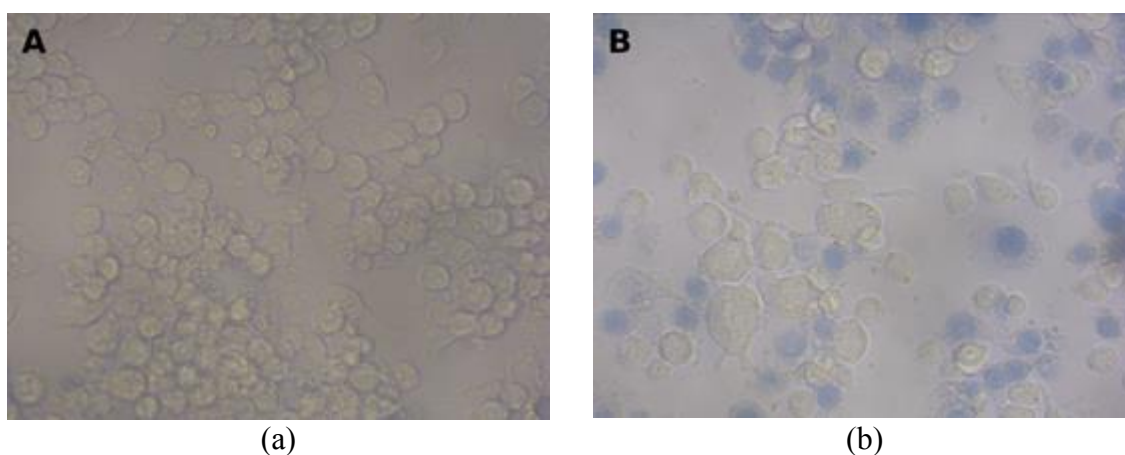
De acordo com os estudos de Breymayer *et al.* (2014), foi observado o efeito de CIAIPc nanoparticulada, observando internalização da ftalocianina, e da ftalocianina nanoparticulada, após 24 horas de incubação. Com esse protocolo foi observada CIAIPc no citoplasma, com evidências de acúmulo endossomal e/ou lisossomal.

É importante apontar que diferentes compostos apresentam afinidade com componentes específicos da célula. Portanto, é compreensível e esperado que a localização intracelular de diferentes fotossensibilizadores seja variada (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005) apontam diversas características esperadas em fotossensibilizadores, como solubilidade e lipofilicidade, por exemplo, que podem interferir na interação do mesmo com a célula alvo, e quais os efeitos que podem ser desencadeados após a TFD.

4.6 Avaliação da viabilidade celular

Para avaliar a porcentagem de morte celular desencadeada após a TFD foi realizado o teste de exclusão do corante azul de tripan. Após a terapia fotodinâmica, se a célula tem perda de função de membrana, entrando em processo de morte, ela permanece corada, em azul. As células viáveis têm a capacidade de selecionar a entrada do corante, impedindo que isso aconteça, ou expelindo o corante que possa entrar eventualmente (Figura 25).

Figura 24: Viabilidade do teste do Azul de Tripan. Em A observamos macrófagos do grupo controle, com membrana intacta, e, portanto, sem coloração. Em B observamos um grupo após tratamento com TFD com $3,0 \mu\text{mol.L}^{-1}$, onde é observado algumas células sem corante (células vivas), e algumas coradas (células mortas).



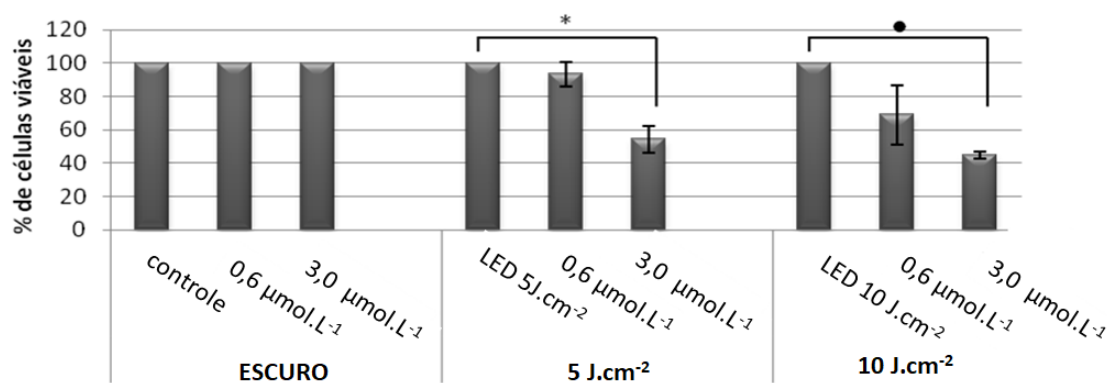
Fonte: Elaborado pela autora.

Dessa forma, observamos na (Figura 25a) um campo referente ao grupo controle, onde grande maioria das células se encontra viável, permanecendo não coradas. Na (Figura 25b) observamos um campo após tratamento de TFD com $3,0 \text{ mol.L}^{-1}$, com algumas células viáveis, e outras inviáveis, coradas em azul.

De todos os grupos, foram capturadas imagens de 10 campos aleatórios, e as células foram contadas utilizando o *software ImageJ*, com a ferramenta Cell counter. Foi realizada a contagem de células totais e em seguida calculadas a porcentagem de células vivas e mortas e o resultado é apresentado na (Figura 26).

As micropartículas de $\mu\text{-CaCO}_3$ na ausência do fotossensibilizador também foram testadas e não apresentaram qualquer efeito sobre a linhagem celular em análise.

Figura 25: Viabilidade celular dos macrófagos avaliada pelo teste de azul de tripan. Os grupos denominados Escuro compreendem amostras mantidas ao abrigo de luz. Os grupos que receberam apenas LED ou TFD estão identificados pela fluência utilizada, de 5 J.cm^{-2} e 10 J.cm^{-2} . (* $\leq 0,01$) (● $\leq 0,01$)



Fonte: Elaborado pela autora.

Em um estudo recente dos nossos grupos de pesquisa foi demonstrado que o fármaco fotossensibilizador ClAlPc em sua forma livre, ou seja, quando não encapsulado em um sistema de liberação não apresenta citotoxicidade em linhagens de macrófagos (ABREU *et al.*, 2019). As micropartículas de CaCO_3 na fase de vaterita na ausência do fármaco (micropartículas vazias) não apresentaram citotoxicidade para o sistema biológico em estudo.

É possível observar redução significativa da viabilidade, nos grupos tratados com a maior concentração, de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, alcançando aproximadamente 50% de redução no grupo tratado com 10 J/cm^2 . Esses dados sugerem resultado dependente da concentração da ftalocianina e da dose de luz utilizada. Com a dose de 5 J/cm^2 foi observada redução da viabilidade após TFD com $0,6 \mu\text{mol.L}^{-1}$, no entanto o resultado não foi significativo.

É importante apontar que nos grupos controle, mantidos no escuro não houve redução na viabilidade, demonstrando que a ftalocianina não é citotóxica para os macrófagos, nessas condições testadas.

De acordo com os estudos de Svenskaya *et al.*, (2016) encapsularam o fotossensibilizador Photosen em micropartículas de CaCO₃ na fase de vaterita para aplicação em TFD. Os autores demonstraram efeito fototóxico significativo usando o ensaio de viabilidade (MTT). Foi observada uma diferença drástica na porcentagem de células viáveis: 2% *versus* 20%, para o fotossensibilizador encapsulado e livre, respectivamente.

Dessa forma, micropartículas de CaCO₃ na fase de vaterita como transportadoras de compostos bioativos, permitem melhorar a eficácia do fotossensibilizador, supondo, portanto, a redução de dose terapêutica aplicada para o fototratamento.

5 CONCLUSÕES

Micropartículas de vaterita ($\mu\text{-CaCO}_3$) são sintetizadas por uma rota de precipitação assistida por PSS. O sistema proposto como DDS foi fabricado com sucesso, o que foi comprovado pelas caracterizações de DRX, MEV e BET, partículas na escala micrométrica, morfologia esférica e com consequente porosidade aparente. Estes fatores possibilitaram a incorporação do fármaco sem alteração em suas propriedades físico-química, como a absorção na região do Uv-Vis. A espectroscopia no IV indicou que a adsorção do fotossensibilizador CIAIPc nas micropartículas de CaCO_3 é de natureza física, o que foi corroborado pelo resultado de DRX.

O processo de internalização da ftalocianina mostrou o FS distribuído no citoplasma, em ambas as concentrações testadas, e a presença da CIAIPc em região correspondente ao núcleo, sobrepondo o sinal com o material nuclear. Pelo ensaio de viabilidade celular com azul de Tripán foi possível observar redução significativa da viabilidade, nos grupos tratados com a maior concentração, de $3 \mu\text{mol.L}^{-1}$, alcançando aproximadamente 50% de redução no grupo tratado com 10 J.cm^{-2} . Este fator pode ser atribuído a maximização das propriedades do fotossensibilizador quando encapsulado em um sistema de liberação para compostos bioativos.

A soma desses efeitos com a simplicidade, escalabilidade e baixo custo de fabricação, biocompatibilidade e alta capacidade de carreamento das partículas de vaterita apresenta a perspectiva de uma nova plataforma para aplicação em TFD.

REFERÊNCIAS

- ABELS, C. Targeting of the vascular system of solid tumours by photodynamic therapy (PDT). **Photochem Photobiol Sci.**, v. 3, p. 765-771, 2004.
- ABREU, A. S. *et al.* Fabrication of polyelectrolyte microspheres using porous manganese carbonate as sacrificial template for drug delivery application. **Journal of Materials Research**, v. 34, n. 8, p. 1353-1362, 2019.
- AGOSTINIS, P. *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin.**, v. 61: p.250-281, 2011;
- AGOSTINIS, P. *et al.* Regulatory pathways in photodynamic therapy induced apoptosis. **Photochem Photobiol Sci.**, v. 3, p. 721-9, 2004.
- ALEXIADES-ARMENAKAS M, Laser-mediated photodynamic therapy. **Clin Dermatol.**, v. 24, n. 1, p. 16-25, Jan-Feb. 2006.
- ANDRADE, J. E. **Síntese, caracterização e modificação de nanopartículas de prata com 5-fluorouracil sob a influência do pH.** 2008. 78f. Dissertação (Mestrado em Física) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2008.
- ANSEL, H. C., POPOVICH, N. G., ALLEN, L. V. Formas farmacêuticas com velocidade controlada e sistemas de liberação de fármacos. In: _____. **Farmacotécnica: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos.** São Paulo: Premier, 2007. cap. 9, p. 283-300.
- AZEVEDO, M. M. M. de. **Sistemas poliméricos de liberação controlada utilizando micro e nanopartículas encapsulando violaceína: caracterização, atividade biológica, conseqüências e perspectivas.** 153 f. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.
- BANFI, E. *et al.* Zinc phthalocyanines-mediated photodynamic therapy induces cell death in adenocarcinoma cells. **Journal of Organometallic Chemistry**, v. 692, n.6, p. 1269-1276, 2007.
- BENVINDO, R. G. *et al.* Efeitos da terapia fotodinâmica e de uma única aplicação de laser de baixa potência em bactérias in vitro. **Fisioterapia e pesquisa**, n.1, p.53-7, 2012.
- BESSLER, K. E.; RODRIGUES, L.C. Os polimorfos de carbonato de cálcio: uma síntese fácil de aragonita. **Química Nova**, v. 31, n. 1, p. 178-180, dez. 2008.
- BIRNBAUM, D.T.; BRANNON-PEPPAS, L. Microparticle drug delivery systems. In: BROWN D. M. (editor). **Drug delivery systems in cancer therapy.** Totowa: Humana Press, 2003. p. 117-136.
- BIZERRA, A.; SILVA, V. Sistemas de liberação controlada: Mecanismos e aplicações. **Revista Saúde e Meio Ambiente**, v. 3, n. 2, p. 1-12, 2016.

BONNETT, R. *et al.* Photophysical properties of 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)-porphyrin (m-THPP), 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)chlorin (m-THPC) and 5,10,15,20-tetrakis(m-hydroxyphenyl)bacterio-chlorin (m-THPBC): a comparative study. **Journal of Chemistry Society Perkin Trans.**, n.2, p. 325-328, 1999.

BONNETT, R.; MARTINEZ, G. Photobleaching of photosensitisers used in photodynamic therapy. **Tetrahedron**, v. 57, p. 9513–9547, 2001.

BOYJOO, Y.; PAREEK, V. K.; LIU, J. Synthesis of micro and nano-sized calcium carbonate particles and their applications. **Journal of Materials Chemistry A**, n. 2, p. 14270-14289, Jun. 2018.

BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in Controlled Drug Delivery. **Medical Plastics and Biomaterials Magazine**, 1997. Disponível em: <https://www.mddionline.com/stub/polymers-controlled-drug-delivery..>

BREYMAYER, J. *et al.* Fluorescence investigation of the detachment of aluminum phthalocyanine molecules from aluminum phthalocyanine nanoparticles in monocytes/macrophages and skin cells and their localization in monocytes/macrophages. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v.11, n.3, p. 380-390, 2014.

BROWN, S.; BROWN, E.; WALKER, I. The present and future role of photodynamic therapy in cancer treatment. **Lancet Oncology**, v. 5, p. 497-508, 2004.

TAI, C.Y.; CHIEN, W.C.; CHEN, C.Y. Crystal growth kinetics of calcite in a dense fluidized-bed crystallizer, **AIChE Journal**, v. 45, n. 8, p. 1605-1614, 1999.

CAI, W.-Y. *et al.* Hemoglobin-CdTe-CaCO₃@Polyelectrolytes 3D Architecture: Fabrication, Characterization, and Application in Biosensing. **Adv. Funct. Mater.**, v. 18, p. 3127-3136, 2008. doi:10.1002/adfm.200800531

CALIXTO, G. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.

CAMERIN, M. *et al.* The in vivo efficacy of phthalocyanine – nanoparticles conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma. **Eur. J. Cancer**, v. 46, n. 10, p. 1910-1918, 2010.

ÇAMUR, M. *et al.* The first comparison of photophysical and photochemical properties of non-ionic, ionic and zwitterionic gallium (III) and indium (III) phthalocyanines. **J. Photochem. Photobiol. A**, v.219, p.217-227, 2011.

CARVALHO, J. A. *et al.* Preparation of gelatin nanoparticles by two step desolvation method for application in photodynamic therapy. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 29, n. 11, p.1287-1301, 27 mar. 2018.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn Ther.**, v. 1, n.4, p. 279 –293, 2004.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part three Photosensitizer pharmacokinetics, biodistribution, tumor localization and modes of tumor destruction. **Photodiagn Photodyn Ther**, v. 2, n. 2, p. 91- 106, 2005.

CHARLESWORTH, P. *et al.* Photophysical studies of substituted porphyrins. **J. Chem. Soc. Faraday Trans.**, v. 90, p. 1073, 1994.

CHARNEY, C. *et al.* Inclusion of ibuprofen in mesoporous template silica: Drug loading and release property. **Eur J Pharm Biopharm.**, v. 57, p. 533–540, 2003.

CHAUHAN, A.; MITTU, B.; CHAUHAN, P. Analytical Method Development and Validation: A Concise Review. **J Anal Bioanal Tech.**,v. 6, p.233, 2015. doi: 10.4172/2155-9872.1000233

CHEN, G. *et al.* Nanochemistry and nanomedicine for nanoparticle-based diagnostics and therapy. **Chem Rev.**, v. 116, n. 5, p. 2826–2885, 2016.

CHEN, J. L. *et al.* Liposomes modified with polycation used for gene delivery: preparation, characterization and transfection in vitro. **Int. J. Pharm.**, v. 343, n. 1-2, p. 255–361, 2007.

CHENG, Y. *et al.* Expertise Modulates the Perception of Pain in Others. **Curr. Biol.**, v. 17, n.19, p.1708-13, Oct. 2007. doi: 10.1016/j.cub.2007.09.020.

CHONG, T. H., SHEIKHOLESLAMI, R. Thermodynamics and kinetics for mixed calcium carbonate and calcium sulfate precipitation. **Chemical Engineering Science**, v. 56, n. 18, p. 5391-5400, Sep. 2001.

COIMBRA, P. M. A. **Preparação e Caracterização de Sistemas de Libertação Controlada de Fármacos com base em Polímeros de Origem Natural**. 2010. 242 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Engenharia Química, Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

COSTA, L. M. M.; DE OLYVEIRA, G. M.; SALOMÃO, R. Precipitated calcium carbonate nano-microparticles: applications in drug delivery. **Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine**, v.3, n. 3, p. 336-340, Nov. 2017.

DABROWSKI, J. M. *et al.* Combined effects of singlet oxygen and hydroxyl radical in photodynamic therapy with photostable bacteriochlorins: Evidence from intracellular fluorescence and increased photodynamic efficacy in vitro. **Free Radical Bio. Med.**, v.52, n.7, p.1188-1200, 2012.

De PAULA, C.S. **Desenvolvimento e Caracterização Fotofísica de Nanoestruturas contendo AlCIPc para a Terapia Fotodinâmica Experimental de Tumores Sólidos**. 2008. 113 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto- Ouro Preto.

DI MASCIO, P. *et al.* Singlet molecular oxygen production in the reaction of peroxyxynitrite with hydrogen peroxide. **FEBS Lett.**, v. 355, n.3, p. 287-289, 1994.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 375-380, 2003.

DOUGHERTY, T. J. *et al.* Photodynamic therapy. **J. Natl. Cancer Inst.**, v. 90, n.12, p. 889–905, 1998.

HAZEN, Robert M. *et al.* Carbon Mineralogy and Crystal Chemistry. Carbon Mineralogy & Crystal Chemistry. **Reviews in Mineralogy & Geochemistry**, v. 75, p. 7-46, 2013.

DURMUS, M. *et al.* Water-soluble quaternized mercaptopyridine-substituted zinc-phthalocyanines: Synthesis, photophysical, photochemical and bovine serum albumin binding properties. **Dyes Pigment.**, v.91, p.153-163, 2011.

EDWARDS, K. A.; BAEUMNER, A. J. Liposomes in analyses. **Talanta**, London, v. 68, n.5, p.1432-1441, 2006.

ETHIRAJAN, M.; CHEN, Y.; JOSHI, P.; PANDEY, R. K.; The Role of Porphyrin Chemistry in Tumor Imaging and Photodynamic Therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, p. 340-362.

FALINI, G. *et al.* Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusc shell macromolecules. **Science**, v. 271, n. 5245, p.67-69, 1996.

FARIA-TISCHER, P. C. S; TISCHER, C. A. Nanobiotechnology: technological platform for biomaterials and biological application of nanostructures. **BBR-Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 32-53, 2012.

FIONA, C.M.; HELMUT, C. Controle de morfologias e estruturas minerais em sistemas biológicos e sintéticos. **Revisões Químicas**, v. 108, p. 4332-4432, 2008.

FREITAS, S; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, n. 2, p. 313-332. Feb. 2005.

GHALANDARLAKI, N.; ALIZADEH, A.; ASHKANI-ESFAHANI, S. Nanotechnology-Applied Curcumin for Different Diseases Therapy. **Biomed Res Int.**, v.2014, p.394264, 2014. doi: 10.1155/2014/394264.

HAN, Yong Sheng *et al.* Factors affecting the phase and morphology of CaCO₃ prepared by a bubbling method. **Journal of the European Ceramic Society**, v.26, n.4, p. 843-847, 2006.

HENCH, L. L.; BEST, S. M. Ceramics, Glasses, and Glass-Ceramics. In: RATNER, B. D. (ed.) *et al.* **Biomaterials Science: An introduction to Materials in Medicine**. Oxford: Academic Press, 2013, cap. I.2.4..

HUANG, L.; CHEN, T. C.; LIN, F. H. Luminol as in situ light source in meso-tetraphenylporphyrin-mediated photodynamic therapy. **Curr. Med. Chem.**, v. 20, p. 1195-1202, 2013.

IBANEZ SIMPLICIO, F.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia Fotodinâmica: Aspectos Farmacológicos, Aplicações e Avanços Recentes no Desenvolvimento de Medicamentos. **Química Nova**, v. 25, p.801-807, 2002.

ISHII, K. Functional singlet oxygen generators based on phthalocyanines. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 256, n. 15-16, p. 1556–1568, 2012.

ISLAM, M. A. et al. Methylene blue adsorption on factory-rejected tea activated carbon prepared by conjunction of hydrothermal carbonization and sodium hydroxide activation processes. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v.52, p.57-64, 2015.

JAFARI, S. *et al.* Methylprednisolone acetate-loaded hydroxyapatite nanoparticles as a potential drug delivery system for treatment of rheumatoid arthritis: in vitro and in vivo evaluations **Eur. J. Pharm. Sci.**, v. 91, p. 225-235, 2016

JORI, G. Far-red-absorbing photosensitizers: their use in the photodynamic therapy of tumours. **Journal of Photochemistry and Photobiology a Chemistry**, v. 62, n. 3, p. 371–378, 1992.

JORI, G. Photodynamic therapy of microbial infections: state of the art and perspectives. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v.25, n. 1-2, p.505-519, 2006.

KABALAH AMITAI, L. *et al.* Vaterite crystals contain two interspersed crystal structures. **Science**, v. 340, n.6131, p. 454-457, 2013.

KARIMI, Keikhosro; TAHERZADEH, Mohammad J. A critical review of analytical methods in pretreatment of lignocelluloses: Composition, imaging, and crystallinity. **Bioresour. Technol.**, v. 200, p. 1008-1018, 2016.

KHARKWAL, S. K. *et al.* Photodynamic therapy for infections: clinical applications. **Lasers Surg. Med.**, v. 43, n. 7, p. 755-767, 2011.

KIRBOGA, S.; ONER, M. Effect of the Experimental Parameters on Calcium Carbonate Precipitation. **Chemical Engineering Transactions**, v. 32, p. 2119-2124, Jun. 2013.

KOLAROVA, H. *et al.* In vitro photodynamic therapy on melanoma cell lines with phthalocyanine. **Toxicology in vitro**, v.21, p. 249–253, Mar. 2007.

KOO, H, *et al.* In vivo targeted delivery of nanoparticles for theranosis. **Acc. Chem. Res.**, v. 44, n.10, p. 1018–1028, 2011.

KÜBLER, A. *et al.* Treatment of oral leukoplakia by topical application of 5-aminolevulinic acid. **Int J Oral Maxillofac Surg.**, v. 27, n.6, p. 466-469, 1998.

LAPTEV, R. et al. Intracellular chemiluminescence activates targeted photodynamic destruction of leukaemic cells. **Br J Cancer**, v. 95, n. 2, p. 189-196, 2006.

LEE, P.I.; LI, J-X. Evolution of oral controlled release dosage forms. In: WEN, H.; PARK K, editors. **Oral Controlled Release Formulation Design and Drug Delivery**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc.; 2010. p. 21–31.

LEEuw, N.H.; PARKER, S.C. Surface structure and morphology of calcium carbonate polymorphs calcite, aragonite, and vaterite: An Atomistic Approach. **J Phys Chem B**, v. 102, n. 16, p. 2914-2922, 1998.

LEMP, A. *et al.* Photosensitized generation of singlet molecular oxygen by aryloxazinones, **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 199, n. 2–3, p. 345–352, 2008.

LI, W. T. Nanotechnology-based Strategies to Enhance the Efficacy of Photodynamic Therapy for Cancers. **Curr. Drug Metab.**, v. 10, n.8, p. 851-860, Oct. 2009. doi: 10.2174/138920009790274559.

LI, J.K. *et al.* A Novel Biodegradable System Based on Gelatin Nanoparticles and Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres for Protein and Peptide Drug Delivery. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 86, p.891-895, 1997.

LIPPMANN, F. **Sedimentary Carbonate Minerals**. Berlin: Springer, 1973.

LOPES, C. M. L.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P. Formas farmacêuticas de liberação modificada: polímeros hidrofílicos. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v. 41, n. 2, p. 143- 54, 2004.

LOWENSTAM, H. A.; WEINER, S. **On Biomineralition**. Oxford: Oxford University Press, 1989.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina (Kaunas)**, v.39, n. 12, p. 1137-1150, 2003.

MACHADO, A. E. A. Cellular changes after Photodynamic Therapy on HEp 2 cells using the New ZnPcBr8 Phthalocyanine, **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 28, p. S143 – S149, 2010.

MACHADO, A. E. H. Terapia Fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.

MACK, J.; KOBAYASHI, N. Low Symmetry Phthalocyanines and their Analogues. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 2, p. 281-321, 2011.

MARTI, C. *et al.* Photophysical properties of neutral and cationic tetrapyrrolineporphyrazines. **Photochemistry and Photobiology**, v. 71, p.53-59, 2000.

MARUYAMA, B. R. *et al.* Nanobiotechnology: A voyage to future. **Veterinary World**, v. 3, n.3, p.145-147, Mar 2010.

MATEI, C. *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of basal cell carcinoma. **J. Med Life**. v. 6, n.1, p. 50-54, Mar. 2013.

MATLABA, P.; NYOKONG, T. Synthesis, electrochemical and photochemical properties of unsymmetrically substituted zinc phthalocyanine complexes. **Polyhedron**, v. 21, n.24, p. 2463 – 2472, 2002.

MESQUITA, M. Q. *et al.* An insight on the role of photosensitizer Nanocarriers for Photodynamic Therapy. **An Acad Bras Cienc.**, v. 90, n. 1 (Suppl 2), p. 1101-1130, 2018.

MIRONOV, A. F.; NECHAEV, A.V. The directed modification of the pyrrole ring D in natural chlorins. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 27, p.120-23, 2001.

MORSE, J. W.; ARVIDSON, R. S.; LUTTGE, A. Calcium Carbonate Formation and Dissolution. **Chemical Reviews**, v. 107, p. 342-381, Jan. 2007.

MOSER, F. H.; THOMAS, A. L **Phthalocyanine Compounds**. New York, Reinhold Pub., 1963. (Monograph series American Chemical Society, n. 157).

MUEHLMANN, L. A. *et al.* Aluminum-phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v.9, p.1199–1213, 2014.

NEUBAUER, M. P.; POEHLMANN, M.; FERY, A. Microcapsule Mechanics: From Stability to Function. **Adv. Interface colóide Sci.**, v. 207, p. 65-80, 2014.

NÚÑEZ, Silvia Cristina; GARCEZ, Aguinaldo Silva; RIBEIRO, Martha Simões. **PDT - terapia fotodinâmica antimicrobiana na odontologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

OCHSNER, M. Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours, **J. Photochem. Photobiol. B**, v. 39, p. 1-18, 1997.

OGUNSIPE, A.; NYOKONG, T. Photophysicochemical consequences of bovine serum albumin binding to non-transition metal phthalocyanine sulfonates. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.4, p.510–516, 2005.

OLIVEIRA, D. S. *et al.* Conhecimento e prática acerca da prevenção do câncer de pele: um estudo com adolescentes. **rev. bras. med.**, v. 70, n. 10, p. 363-367, 2013.

OLIVEIRA, K. T. *et al.* Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310–335, 2015.

PENG, C.; ZHAO, Q.; GAO, C. Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO₃ and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO₃ microparticles. **Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp.**, v. 353, n.2-3, p. 132-139, 2010.

PERUSSI, Janisse R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, São Carlos, v. 30, n. 4, p. 988-994, 2007.

PRIMO, F. L. **Estudos fotofísicos e in vitro em modelo animal do fármaco fotossensibilizador Foscan® incorporado em nanoemulsão: avaliação como sistema de liberação em Terapia Fotodinâmica do câncer de pele**. 2006. 142 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade de São Paulo - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2006.

QIU, H. *et al.* Calcium carbonate microspheres as carriers for the anticancer drug camptothecin. **Mater. Sci. Eng. C.**, v. 32, n.8, p. 2634–2640, 2012.

RAAB, O. Effect of fluorescent substances on Infusoria. **Zeitschrift fur Biologie**, v. 39, p.524-546, 1900.

- RADHA, A.V.; NAVROTSKY, A. Thermodynamics of Geochemistry. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 77, n. 1, p. 73-121, 2013. doi: <https://doi.org/10.2138/rmg.2013.77.3>
- RIBEIRO, J. N.; JORGE, R. A. Determinação do mecanismo de destruição de células mediado por meso-tetramesityporfirina, octaetilporfirina, octaetilporfirina de vanadil e luz visível. **Eclet. Quím.**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 7-13, 2005.
- RIZVI, I. *et al.* Synergistic enhancement of carboplatin efficacy with photodynamic therapy in a three-dimensional model for micrometastatic ovarian cancer. **Cancer Res.**, v. 70, p. 9319-9328, 2010.
- ROBERTSON, C.A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **J. Photochem. Photobiol. B Biol.**, v. 96, n. 1, p. 1-8, 2009.
- ROCHA, I. R. *et al.* Photobiostimulation Reverses Allodynia And Peripheral Nerve Damage in Streptozotocin: Induced Type1 Diabetes. **Lasers Med Sci.**, v. 32, n.3, p. 495- 501, 2017.
- ROCHA, L. B. *et al.* **Terapia Fotodinâmica para Tratamento do Cancro**. Coimbra: Imprensa da Universidade de Coimbra, 2015. [URI:http://hdl.handle.net/10316.2/36927](http://hdl.handle.net/10316.2/36927)
- RODRIGUEZ-NAVARRO, C.; ELERT, K.; SEVCIK, R. Amorphous and crystalline calcium carbonate phases during carbonation of nanolimes: implications in heritage conservation. **CrystEngComm**, v.18, n.35, p.6594-6607, 2016.
- ROSSANEZI, G. **Micropartículas biodegradáveis para liberação prolongada de Ceterolaco de trometamina obtidas por Spray drying**. 2008, 68f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.
- WEINER, S.; SAGI, I.; ADDADI, L. Choosing the Crystallization Path Less Traveled. **Science**, v.309, n.5737, p.1027, 2005.
- SAIF, M. W. U.S. Food and Drug Administration approves paclitaxel protein-bound particles (Abraxane®) in combination with gemcitabine as first-line treatment of patients with metastatic pancreatic cancer. **Journal of the Pancreas**, v.14, n.6, p. 686-688, 2013. <https://doi.org/10.6092/1590-8577/2028>.
- SANCHES, A. *et al.* Photophysical properties of glucoconjugatedchlorins and porphyrins and their associations with cyclodextrins, **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v. 81, p. 154-162, 2005.
- SARAYA, M. E. I.; ROKBAA, H. H. A. L. Preparation of Vaterite Calcium Carbonate in the Form of Spherical Nano-size Particles with the Aid of Polycarboxylate Superplasticizer as a Capping Agent, **American Journal of Nanomaterials**, v. 4, n. p. 44-51, 2016.
- SCHAFFAZICK, S. R. *et al.* Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, p.726-737, 2003

SELLERA, Fábio Parra; GARGANO, Ronaldo Gomes; POGLIANI, Fabio Celidonio. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura. **MV&Z: revista de educação continuada em medicina veterinária e zootecnia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 6-13, 2014. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/recmvz/article/view/23097>

SENGE, M. O. mTHPC drug on its way from second to third generation photosensitizer Photodiagnosis Photodyn Ther., v. 9, n.2, p. 170-179, 2012.

SETÚBAL, C. A. **Procura por novos fotossensibilizadores para uso em terapia fotodinâmica**. 2007. 101 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

SHARMAN, W. M.; ALLEN, C.M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications. **Drug Disc. Today**, v.4, p. 507–517, 1999.

SIBATA, C. H. *et al.* Photodynamic Therapy: a new concept in medical treatment. **Brazilian Journal of Medical and Biology Research**, v. 33, n. 8, p. 869-880, 2000.

SIBATA, M. N.; TEDESCO, A. C.; MARCHETTI, J. M. Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for photodynamic therapy use. **European Journal Pharmacy Science**, v.23, n. 2, 131-138, 2004.

SILVA, R. C. **Avaliação da eficiência fotodinâmica de fotossensibilizadores com aplicação em terapia fotodinâmica**. 2007. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2007.

SIMIONI, A. R. *et al.* Photophysical and Photobiological Studies of a Silicon Tribenzonaphthoporphyrinato Incorporated into Liposomes for Photodynamic Therapy Use. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 8, p. 3208-3215, 2008.

SINGH, A.; SETTLEMAN, J. EMT, cancer stem cells and drug resistance: an emerging axis of evil in the war on cancer. **Oncogene**, v.29, n. 34, p. 4741-4751, Aug. 2010.

SINGH, B. *et al.* Optimizing Drug Delivery Systems Using Systematic Design of Experiments. Part II: Retrospect and Prospects. **Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 22, n. 3, p. 215–93, 2005.

SLATER, A. G.; COOPER, A. I. Function-led design of new porous materials. **Science**, v. 348, n. 6238, p. 988, 2015. DOI: 10.1126/science.aaa8075

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by lower methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.17, p.246 – 254, 2012.

SOLBAN, N.; RIZVI, I.; HASAN, T. Targeted photodynamic therapy. **Lasers Surg Med**, v. 38, p. 522-531, 2006.

SOUZA, K. C. *et al.* Mesoporous Silica-Magnetite Nanocomposite Synthesized by Using a Neutral Surfactant. **Nanotechnology**, v. 19, n.18, p. 185603, 2008. doi: 10.1088/0957-4484/19/18/185603.

SPERANDIO, Y- Y.; HUANG, M.R.; HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic therapy to kill Gram-negative bacteria. **Recent Pat. Antiinfect. Drug Disco.**, v., 8, n.2, p. 108-120, 2013.

STERNBERG, E. D.; DOLPHIN, D.; BRUCKNER, C. Porphyrin-based Photosensitizers for Use in Photodynamic Therapy. **Tetrahedron**, Berkeley, CA, v. 447, n. 54, p.4151-4202, 28 Jul. 1998.

STEVANOVIC, M. *et al.* Poly(DL-lactide-co-glycolide) Nanospheres for the Sustained Release of Folic Acid. **J. Biomed. Nanotechnol.**, v. 4, n.3, 2008. DOI:10.1166/jbn.2008.321

SVANBERG, K. *et al.* Clinical multi-colour fluorescence imaging of malignant tumours - initial experience. **Acta Radiol.**, v.39, p. 2-9, 1998.

SVENSKAYA, Y. I. *et al.* Calcium Carbonate Microparticles Containing a Photosensitizer Photosens: Preparation, Ultrasound Stimulated Dye Release, and In Vivo Application. **Nanotechnologies in Russia**, v. 9, n. 7-8, p. 398-409, 2014.

SVENSKAYA, Y. I. *et al.* Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 171-179, 2016.

SVENSON, S. Dendrimers as versatile platform in drug delivery applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**.v.71, p. 445-462, 2009.

SZACIŁOWSKI, K. *et al.* Bioinorganic photochemistry: frontiers and mechanisms. **Chem Rev.**, v. 105, n. 6, p.2647-2694, 2005.

TANAKA, M. *et al.* Optimal Photosensitizers for Photodynamic Therapy of Infections Should Kill Bacteria but Spare Neutrophils. **Photochemistry and Photobiology**, v. 88, p. 227-232, 2012.

TAPAJÓS, E. C. C. *et al.* In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum phthalocyanine. **Oral Oncology**, v. 44, p.1073-1079, 2008.

TOREZAN, L.A. Terapia fotodinamica em dermatologia. In: _____. **Laser em dermatologia**. 2 ed. Sao Paulo: Editora Roca; 2009. p.187-94.

TRUSHINA, D. B. *et al.* CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications. **Materials Science and Engineering C**, v. 45, p. 644-658, Dec. 2014.

TSUBONE, T. M. *et al.* Aggregation of aluminum phthalocyanine hydroxide in water/ethanol mistures. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.25, p. 890- 897, 2014.

USUDA, J. *et al.* Photodynamic Therapy (PDT) for Lung Cancers. **Journal of Thoracic Oncology**, v.1, n. 5, p. 489-493, 2006.

VAN LIER, J.; SPIKES, J. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phtalocyanines. **Ciba Foundation Symposium**, v. 149, p.17-26, 1989.

VIOR, M. C. G. *et al.* A comparative study of a novel lipophilic phthalocyanine incorporated into nanoemulsion formulations: Photophysics, size, solubility and thermodynamic stability, **Dyes and Pigments**, v.91, p.208-214, 2011.

VOLODKIN, D. V.; LARIONOVA, N. I.; SUKHORUKOV, G. B. Protein Encapsulation via Porous CaCO₃ Microparticles Templating, **Biomacromolecules**, v. 5, n. 5, p. 1962-1972, Sep. 2004.

VOLODKRIN, A. I. *et al.* Matrix polyelectrolyte microcapsules: new system for macromolecule encapsulation. **Langmuir**, v. 20, n. 8, p. 3398–3406, 2004.

LEE, Thomas Wai-Yip; ROBINSON, Joseph R. Controlled-release drug delivery system. In: ALLEN JR, Loyd V. (Editor). **Remington: The science and practice of pharmacy**. 20th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. V.1.

WANG, C. *et al.* Combination of adsorption by porous CaCO₃ microparticles and encapsulation by polyelectrolyte multilayer films for sustained drug delivery. **Int J Pharm.**, v. 308, n. 1-2, p. 160-167, 2006.

WANG, F. *et al.* In situ coacervated microcapsules with filled polyelectrolytes and charge-controlled permeation for dye molecules. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 209, p. 957-966, 2008.

XIANG, L. *et al.* Influence of chemical additives on the formation of super-fine calcium carbonate. **Powder Technology**, v. 126, n. 2, p. 129-133, jul. 2002.

YANG, P.; GAI, S.; LIN, J. Functionalized mesoporous silica materials for controlled drug delivery. **Chem Soc Rev**, v.41, p.3679–3698, 2012.

YAO, C. H. *et al.* Biocompatibility and biodegradation of a bone composite containing tricalcium phosphate and genipin crosslinked gelatina. **Journal of Biomedical Materials Research: Part A**, v. 69, p.709-717, 2004.

YAVLOVICH, Amichai *et al.* Light-sensitive lipid-based nanoparticles for drug delivery: design principles and future considerations for biological application. **Molecular Membrane Biology**, v.27, n.7, p.364-381, Oct. 2010.

ZHANG, X. F.; GUO, W. Imidazole functionalized magnesium phthalocyanine photosensitizer: Modified photophysics, singlet oxygen generation and photooxidation mechanism. **J. Phys. Chem. A**, v. 116, p. 7651–7657, 2012.

ANEXOS

Nosso grupo de pesquisa concentra-se na área de Síntese Orgânica sendo que um dos enfoques é centrado no desenvolvimento e caracterização de sistemas micro e nanoparticulados para aplicação em TFD.

Até o presente momento de desenvolvimento da dissertação de mestrado foram apresentados trabalhos em congressos relacionados ao tópico proposto como temática da dissertação:

- ✓ **Eliane de Fátima Souza**, Vitor Luca Moura Marmo, Pedro Augusto Rodrigues Ribeiro de Castro, Milton Beltrame Junior, Erika Peterson Gonçalves, Andreza Simioni, *Produção de micropartículas de vaterita para aplicação em Terapia Fotodinâmica: análise das condições de síntese*, IX Workshop de Design e Materiais e III Congresso Internacional, Centro Universitário Teresa D'Ávila – UNIFATEA, Lorena/SP, junho de 2019.

- ✓ **Eliane de Fátima Souza**, Bruna Cristina dos Santos Pinto, Jessica Aparecida Ambrósio, Daniele da Silva Godoy, Milton Beltrame Júnior, Erika Peterson Gonçalves e Andreza Ribeiro Simioni, *Micropartículas de μ -CaCO₃ encapsulada com ftalocianina de cloro-alumínio para aplicação em terapia fotodinâmica*, XIX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XIX EPG), Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos/SP, outubro de 2019.

- ✓ **Eliane de Fátima Souza**, Bruna Cristina dos Santos Pinto, Jessica Aparecida Ambrósio, Daniele da Silva Godoy, Milton Beltrame Júnior, Erika Peterson Gonçalves e Andreza Ribeiro Simioni, *Fabricação de micropartículas de vaterita para aplicação em terapia fotodinâmica*, I CDNB Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia, junho de 2020.



Certificamos que o trabalho intitulado

Produção de micropartículas de vaterita para aplicação em Terapia Fotodinâmica: análise das condições de síntese

de autoria de

Eliane de Fátima Souza, Vitor Luca Moura Marmo, Pedro Augusto Rodrigues Ribeiro de Castro, Milton Beltrame Junior, Erika Peterson Gonçalves, Andreza Simioni

foi apresentado no IX Workshop de Design e Materiais e III Congresso Internacional, ocorrido nos dias 03, 04, 05 e 06 de junho de 2019, no Centro Universitário Teresa D'Ávila - UNIFATEA, Lorena/SP.

Prof. Dr. Wellington de Oliveira
Reitor

Prof. Dr. Rosinei Batista Ribeiro
Pró-reitor de Pesquisa, Pós-Graduação e Extensão



4fc165f714fa22b95b1a7019b0ba0bea

CERTIFICADO

Certificamos que **Eliane de Fátima Souza** apresentou o trabalho intitulado de **FABRICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE VATERITA PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA** de autoria de Eliane de Fátima Souza; Jéssica A. R. Ambrósio; Bruna C. dos Santos Pinto; Milton Beltrame Junior; Erika P. Gonçalves; Andreza R. Simioni, na forma de *e-Pôster* no I Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (I CDNB) organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia e pela *startup* NanoDiversity no período de 01 a 04 de junho de 2020.

Luciano Paulino da Silva

Luciano Paulino da Silva
Coordenador do I CDNB
Pesquisador Embrapa

Bonatto

Cíntia Caetano Bonatto
Vice Coordenadora do I CDNB
Pesquisadora NanoDiversity



Laboratório de
Nanobiotecnologia



XXIII INIC
XIX EPG
XIII INIC
IX INID

**O LOCAL
FRETE AO GLOBAL:**



**PESQUISA, CIÊNCIA E OS
POUOS INDÍGENAS DO BRASIL**

24 E 25 DE OUTUBRO | WWW.INICEPG.UNIVAP.BR

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "**MICROPARTÍCULAS DE μ -CaCO₃ ENCAPSULADA COM FTALOCIANINA DE CLORO-ALUMÍNIO PARA APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**" de autoria de Eliane de Fátima Souza, Bruna Cristina dos Santos Pinto, Jessica Aparecida Ambrósio, Daniele da Silva Godoy, Milton Beltrame Júnior, Erika Peterson Gonçalves e Andreza Ribeiro Simioni, foi **ACEITO** para apresentação e publicação nos anais do XIX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XIX EPG), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 24 e 25 de outubro de 2019.

São José dos Campos, 25 de outubro de 2019.



Sandra Maria Fonseca da Costa

Profa. Dra. Sandra Maria Fonseca da Costa
Pró-reitora de Pesquisa e Pós-Graduação Stricto-Sensu