



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**Inativação fotodinâmica e fototérmica de *Escherichia coli* e
Staphylococcus aureus via nanopartículas de polímeros
conjugados**

HYGOR CHAVES DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Campo Grande – MS
Fevereiro/2025

INSTITUTO DE FÍSICA- INFI
Cidade Universitária | Unidade 5 |
Fone 67 3345 7485
79070-900 | Campo Grande | MS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DOS MATERIAIS

**Inativação fotodinâmica e fototérmica de *Escherichia coli* e
Staphylococcus aureus via nanopartículas de polímeros
conjugados**

HYGOR CHAVES DA SILVA

Orientador: Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires

Dissertação apresentada a banca examinadora, como critério parcial de aprovação para a obtenção do título de Mestre em Ciência dos Materiais do Programa de Pós-graduação em Ciência dos Materiais (PPGCM) do Instituto de Física (InFi) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), sob a orientação do Prof. Dr. Anderson Rodrigues Lima Caires.

Campo Grande – MS
Fevereiro/2025

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família por todo o suporte durante o desenvolvimento do mestrado. Em especial, sou grato à minha mãe, Fermina A. Chaves, que apesar de não ter tido a oportunidade de estudar, sempre acreditou na educação como um meio para o nosso desenvolvimento. Deixo a minha esposa, Livia R. Ferreira, meus sinceros agradecimentos por apoiar meu desenvolvimento na vida acadêmica, profissional e pessoal.

Meus agradecimentos a todos os professores, em especial aos meus orientadores. Primeiramente, ao professor Dr. Samuel L. de Oliveira, que, durante toda a minha graduação, foi meu orientador e dedicou horas a me ensinar a redigir um texto científico. Logo, grande parte da qualidade do presente trabalho se deve à sua dedicação. Não menos importante, ao professor Dr. Anderson R. L. Caires, meu orientador durante o mestrado, agradeço por todo o suporte, apoio e compreensão diante das típicas situações adversas da vida acadêmica no Brasil.

Também agradeço ao Grupo de Óptica e Fotônica por todo o auxílio, em especial ao Me. Joelson, pela contribuição no processo de síntese das nanopartículas e pelos ensinamentos. Ao doutorando Me. Leandro O. Araújo, à pós-doutoranda Dr. Regiane G. Lima e à Dr. Cynthia S. A. Caires, agradeço pelas enriquecedoras discussões e pelo auxílio em diversas medidas.

Por fim, e não menos importante, agradeço à CAPES pela bolsa de mestrado recebida durante toda a execução da minha pesquisa. Assim como as outras instituições de fomento à pesquisa, tais como CNPq e FUNDECT.

*A minha filha Sophia R. F. Chaves —
você merece um futuro maravilhoso, como cientista
estarei tentando construí-lo para você.*

*Nós somos uma forma do cosmos conhecer a si
mesmo – Carl Sagan*

RESUMO

Este trabalho investigou a síntese, caracterização e ação fotodinâmica de nanopartículas (NPs) dos polímeros conjugados (PCs) poly-(2,5-di-hexyloxy-cyanoterephthalylidene) (Cn-PPV), poly[2,6-(4,4-bis-(2-ethylhexyl)-4H-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']dithiophene)-alt-4,7(2,1,3-benzothiadiazole)] (PCPDTBT) e a nova blenda, oriunda da mistura de Cn-PPV e PCPDTBT, nomeada de Cn-TBT, cujas nanoestruturas foram denominadas de Cn-TBT-NPs, visando a fotoinativação bacteriana. A eficácia dessas NPs foi avaliada contra *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva) e *Escherichia coli* (Gram-negativa), utilizando irradiação com luz visível. As NPs demonstraram eficiência na geração de espécies reativas de oxigênio EROs e $^1\text{O}_2$, além de induzirem efeitos fototérmicos quando irradiadas com laser no infravermelho (806 nm), resultando em inviabilização bacteriana. Dentre as NPs sintetizadas, as Cn-TBT-NPs destacaram-se por combinar as propriedades fotodinâmicas e fototérmicas dos polímeros originais, resultando em maior eficácia na inativação de *S. aureus* quando submetida a concentração de $8 \mu\text{g mL}^{-1}$. Essa maior eficiência pode ser atribuída à maior permeabilidade da parede celular da *S. aureus*, facilitando a penetração. As Cn-TBT-NPs também apresentaram maior rendimento na geração de $^1\text{O}_2$. Em contraste, *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa com estrutura de parede celular mais complexa, exigiu uma concentração maior que $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ para alcançar uma inativação similar. Os resultados sugerem que as Cn-TBT-NPs apresentam grande potencial como fotossensibilizadoras, especialmente no combate a bactérias Gram-positivas. A sinergia entre os efeitos fotodinâmicos e fototérmicos, aliada à capacidade de absorção de luz visível, oferece uma abordagem promissora para a inativação fotodinâmica antimicrobiana. Este estudo reforça a importância do desenvolvimento de novas nanoestruturas no combate à resistência antimicrobiana, proporcionando uma alternativa eficaz e segura aos tratamentos convencionais.

Palavras-chaves: Processos fotoinduzidos, Nanotecnologia aplicada, Engenharia de materiais e Mecanismos de inativação.

SUMÁRIO

1. Introdução	16
1.1. Doenças infecciosas e bactérias	16
1.2. Mecanismo de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e sua transferência	20
1.3. Tratamentos: convencional e alternativos (inativação fotodinâmica).....	23
1.4. Moléculas de Interesse em aIFD	28
1.5. Fontes de Luz	30
1.6. Mecanismo de ação de nanopartículas semicondutoras.....	31
1.7. Polímeros conjugados	33
1.8. Nanopartículas de polímeros conjugados	34
2. Objetivo geral.....	37
2.1. Objetivos específicos	37
3. Metodologia	38
3.1. Preparo das nanopartículas.....	38
3.2. Caracterizações espectroscopias: no ultravioleta próximo e visível (UV-Vis), fluorescência e tempo-de-vida	40
3.3. Espalhamento dinâmico da luz e Potencial Zeta.....	41
3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das NPs	42
3.5. Geração de espécies reativas de oxigênio	42
3.6. Gradiente de temperatura	44
3.7. Inativação fotodinâmica.....	44

3.8. Inativação fototérmica.....	46
3.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das bactérias inativadas	46
4. Resultados e discussões	47
4.1. Espalhamento dinâmico da luz e Potencial Zeta.....	47
4.2. Espectroscopia UV-Vis, fluorescência e tempo-de-vida	53
4.3. Microscopia eletrônica de varredura das NPs.....	65
4.4. Geração de EROs, fotoinativação e imagens de MEV das bactérias.....	67
4.5. Gradiente de temperatura, termoinativação e imagens de MEV das bactérias	76
4.6. Mecanismo de inativação.....	80
5. Conclusões	81
6. Referências.....	82

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1: Esquema mundial de mortes atribuíveis a microrganismos resistentes a antibióticos todos os anos até 2050.	18
Figura 2: Mortes atribuídas a microrganismos resistentes a antibióticos todos os anos em comparação com outras causas relevantes de mortes até 2050.	19
Figura 3: Esquema de transferências vertical e horizontal de genes resistentes entre bactérias.	21
Figura 4: Esquema de transferência de genes horizontais.	22
Figura 5: Ilustração da quantia de publicações com os termos: (A) <i>photodynamic inactivation</i> ou, <i>photodynamic therapy</i> ou <i>photoinactivation</i> e (B) <i>photothermal</i>	25
Figura 6: Ação multissítios da inativação fotodinâmica (tratamento alternativo) frente à ação localizada dos antibióticos (tratamento convencional).	27
Figura 7: Diagrama de Jablonski simplificado. RV – Relaxação vibracional, CI – conversão interna, $^1\text{O}_2$ – oxigênio singleto (estado excitado) e $^3\text{O}_2$ – oxigênio tripleto (estado fundamental do oxigênio molecular).	29
Figura 8: Representação do monômero do polímero conjugado Cn-PPV.	35
Figura 9: Representação do monômero do polímero conjugado PCPDTBT.	36
Figura 10: Processo de nanoprecipitação esquematizado.	40
Figura 11: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico médio das NPs de (A) PCPDTBT, (B) Cn-PPV e (C) Cn-TBT, com os dois picos de cada distribuição de diâmetros (D_1 e D_2). As medidas foram realizadas com as NPs diluídas em água destilada filtrada e todas as NPs foram empregadas com a concentração de $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$	48
Figura 12: (A) Perfis de absorção dos polímeros (linhas tracejadas) em THF; (B) espectros das nanopartículas (linhas sólidas) e <i>Tween 20</i> em meio aquoso; (C–E) comparação dos perfis dos polímeros em THF com suas formas nanoparticuladas.	54

Figura 13: Perfis de fluorescência dos polímeros em THF (linhas tracejadas), das NPs em água (linhas solidas) e do Tween 20 (linha preta). Os compostos foram excitados em 460 nm (A), 380 nm (B), 550 nm (C) e 700 nm (D). Todas as soluções foram empregadas em concentrações de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com exceção do <i>Tween 20</i> que foi empregada a 0,48 mg mL^{-1}	57
Figura 14: Normalização da contagem de elétrons excitados em função do tempo de excitação das NPs de polímeros. Todas as soluções foram empregadas em concentrações de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ com exceção do <i>Tween 20</i> que foi empregada a 0,48 mg mL^{-1}	63
Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das PCPDTBT-NPs (A-C), Cn-PPV-NPs (D-F) e Cn-TBT-NPs (G-I). Todas as soluções que foram posteriormente secas para obtenção das imagem estavam inicialmente com concentrações de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$	66
Figura 16: Cinética de degradação do DHE, monitoração da banda de absorbância em 359 nm de 0-37 min (A) e na fase irradiada de 10-37 min – totalizando 27 min sob irradiação - (B). A lâmpada indica onde a irradiação iniciou. O DHE foi empregado na concentração de 100 μM , as NPs a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o <i>Tween 20</i> a 0,48 mg mL^{-1}	68
Figura 17: Cinética de degradação do DPBF, em (A) monitoramento da absorção em 415 nm normalizada e (B) período de 10 – 30 min da parte (A) com suas regressões lineares. A lâmpada indica o momento em que a irradiação iniciou. O DPBF foi empregado na concentração de 48 μM , as NPs a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o <i>Tween 20</i> a 0,48 mg mL^{-1}	70
Figura 18: Plaqueamento das bactérias <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> de seus grupos escuros (Esc) e irradiados (Irr) de todas as concentrações estudadas.	72
Figura 19: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC mL^{-1}) das bactérias <i>S. aureus</i> (A) e <i>E. coli</i> (B). # redução >99,99% e * redução de 99,94%.	73
Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da morfologia antes e após bioensaios de inativação fotodinâmica. <i>S. aureus</i> antes da irradiação (escuro): (A) grupo controle negativo, (B) PCPDTBT-NPs, (C) Cn-PPV-NPs e (D) Cn-TBT-NPs, todos sem alterações morfológicas. <i>S. aureus</i> após a irradiação: (E) controle irradiado apresentando leves danos por cromóforos endógenos, (D) PCPDTBT-NPs exibindo parede rugosa, (E) Cn-PPV-NPs com rugosidade e vazamento de fluido, e (F) Cn-TBT-NPs com rugosidade intensa e vazamento de fluido. <i>E. coli</i> antes da irradiação (escuro):	

(I) grupo controle negativo, (J) PCPDTBT-NPs, (K) Cn-PPV-NPs e (L) Cn-TBT-NPs, todos sem danos. *E. coli* após a irradiação: (M) controle irradiado apresentando danos leves, (N) PCPDTBT-NPs com formação de bolhas na parede bacteriana, (O) Cn-PPV-NPs com parede rompida e vazamento de fluido, e (P) Cn-TBT-NPs com rugosidade e ruptura da parede. Em todos os grupos tratados (B-D, F-H, J-L e N-P) é possível observar corpúsculos esféricos, atribuídos às NPs. A concentração utilizada de NPs nos ensaios das imagens foi de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, já os inoculos de bacterias estavam inicialmente em 0,5 da escala Mcfarland..... 74

Figura 21: Gradiente de temperaturas do PBS, da NPs de PCPDTBT, Cn-PPV e Cn-TBT, irradiadas com laser. Com exceção da concentração de $7,5 \mu\text{g}$ 76

Figura 22: Plaqueamento dos grupos estudados de ambas as bactérias antes e com 20 min de irradiação sob laser após 24h de incubação e com diluição de 1:32 antes de serem semeadas. 77

Figura 23: Contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL^{-1}) de *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) dos grupos tratados entre 0 e 20 min. Redução de # 99,84 % e * 99, 83%..... 78

Figura 24: Imagens de microscopia eletrônica de varredura após inativação termodinâmica com laser de 806 nm, dose de radiação de 1680 J/cm^2 e concentrações de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em (A) e (B) *S. aureus* tratado com PCPDTBT-NPs (completamente destruída) e Cn-TBT-NPs (superfície danificada, exibindo desintegração da membrana), respectivamente. Em (C) e (D) de *E. coli* tratada com PCPDTBT-NPs (superfície rugosa e formação de poros) e Cn-TBT-NPs (rugosidade superficial, sem evidência de porosidade), respectivamente. A concentração utilizada de NPs nos ensaios das imagens foi de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, já os inoculos de bacterias estavam inicialmente em 0,5 da escala Mcfarland. 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultados do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), potencial Zeta e PDI de algumas Nanopartículas produzidas por nanoprecipitação com proporção de fase orgânica aquosa de 1:5.....	49
Tabela 2: Constante de geração de espécies reativas de oxigênio (KEROs) em milimols por min (mM min^{-1}) de cada nanopartícula.....	68
Tabela 3: Constante de geração de oxigênio singleto (K1O2) em milimols por minuto (mM min^{-1}) de cada nanopartícula.....	71

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SIMBOLOS

ATCC	Anatomical Therapeutic Chemical Code
BHI	Brain heart infusion
CCPD	Centros de Controle e Prevenção de Doenças
CI	cruzamento interno
Cn-PPV	Polímero poly-(2,5-di-hexyloxy-cyanoterephthalylidene)
Cn-PPV-NPs	Nanopartículas de Cn-PPV
Cn-TBT	Micela Poly(2,5-di-hexyloxy-cyanoterephthalylidene-co-2,6-(4,4-bis-(2-ethylhexyl)-4H-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']dithiophene-alt-4,7(2,1,3-benzothiadiazole))
Cn-TBT-NPs	Nanopartículas da micela Cn-TBT
DH	2-hidroxietdio
DHE	Dihidroetdio para Fluorescncia
DHM	Dimetro hidrodinmico médio
DMCNPs	Nanopartículas de polímeros dicetopirrolpirrol-tienotiofeno
DMSO	Dimetilsulfxido
DNA	cido Desoxirribonucleico
DOPC	Matriz 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphocholine
DOPE	Matriz 1,2-dioctanoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine
DPBF	1,3-diphenylisobenzofuran
ϵ	Permissibilidade elétrica
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDL	Espalhamento dinâmico da luz
EROs	Espécies reativas de oxigênio
Esc	Grupo escuro
<i>et al.</i>	e outros
F(Ka)	Função de Henry
FS	Fotossensibilizador
FSs	Fotossensibilizadores
GTA	Glutaraldeído

H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HOCl	Ácido hipocloroso
aIFD	Inativação fotodinâmica antimicrobiana
IFT	Inativação fototerápica
Irr	Irradiado
Laser	Acrônimo inglês para <i>light amplification by stimulated emission of radiation</i> , ou seja, amplificação de luz por emissão estimulada de radiação
LEDs	Diodos emissores de luz (do inglês: <i>light emitting diodes</i>)
MEH-PPV	Poli[2-metoxi-5-((2-etilhexil)oxi)-p-fenilenevinileno]
MEV	Microscopia eletrônica de varredura
MRA	microrganismos resistentes a antibióticos
<i>mrc⁻¹</i>	Gene com característica resistente à colistina
MRSA	<i>S. aureus</i> resistente a metilina
NPs	Nanopartículas
O ₂ ⁻	Superperóxido
OMS	organização mundial de saúde
ONOO ⁻	Peroxinitrito
π	Orbital pi (ligante)
σ	Orbital sigma (antiligante)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCA	<i>Plate Count Agar</i>
PCPDTBT	Polímero poly[2,6-(4,4-bis-(2-ethylhexyl)-4H-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']dithiophene)-alt-4,7(2,1,3-benzothiadiazole)]
PCPDTBT-NPs	Nanopartículas de PCPDTBT
PCs	Polímeros conjugados
PCs-NPs	Nanopartículas de polímeros conjugados
PdI	Índice de polidispersividade
PDPPTT	Polímeros dicetopirrolpirrol-tienotiofeno
pH	Potencial hidrogeniônico
PIB	Produto interno bruto
Rpm	Rotações por minuto

RV	Relaxação vibracional
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TFD	Terapia Fotodinâmica
THF	Tetraidrofurano
TiO ₂	Dióxido de titânio
UTIs	Unidades de tratamentos intensivos
UV/Vis	Ultravioleta e visível.
°C	Grau Celsius
cm	Centímetros
e ⁻	Elétron
h	Hora
J cm ⁻²	Joules por centímetro quadrado
mW	Miliwatts
mW cm ⁻²	Miliwatts por centímetro quadrado
Na	Sódio
O ₂	Oxigênio molecular
³ O ₂	Oxigênio tripleto
¹ O ₂	Oxigênio singleto
•O ₂ ⁻	Superóxido
•OH	Radical hidroxila
μL	Microlitros
μm	Micrômetros
μM	Micromolar
%	Porcentagem
μg	Microgramas
mL	Mililitro
μg mL ⁻¹	Microgramas por mililitro

1. Introdução

A resistência aos antibióticos emergiu como um dos maiores desafios globais na saúde pública. A utilização inadequada e indiscriminada de antibióticos facilita o surgimento de bactérias resistentes a múltiplos medicamentos, resultando em cepas multirresistentes. Conforme os centros de controle e prevenção de doenças, pacientes infectados com *S. aureus* resistente à metilina (MRSA) têm uma chance 64% maior de perecer em comparação com aqueles infectados por cepas não resistentes (Ferreira *et al.*, 2023; Spagnolo, 2024). Em 2019 (Kavanagh, 2019), nos Estados Unidos, foram relatados aproximadamente 120.000 casos de infecção por MRSA, levando a mais de 20.000 mortes globalmente, a situação é igualmente alarmante; em 2021, cerca de 500.000 pessoas desenvolveram tuberculose multirresistente (OMS, 2022). A Organização Mundial da Saúde (OMS, 2022) indicou que havia 43 antibióticos em desenvolvimento clínico para combater patógenos prioritários, mas apenas seis foram classificados como inovadores.

A Inativação Fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) tem se mostrado uma abordagem promissora no tratamento de infecções bacterianas e fúngicas, especialmente em um contexto de crescente resistência aos antibióticos (Gholami *et al.*, 2023). Esta técnica utiliza corantes e substâncias fotossensibilizadoras, que podem ser naturais ou sintéticas, para tratar doenças e combater microrganismos via processo fotodinâmico. Sob iluminação adequada, esses fotossensibilizadores (FSs) promovem eventos fotofísicos, fotoquímicos e fotobiológicos que destroem seletivamente o tecido celular dos microrganismos. A aIFD oferece uma vantagem significativa, pois a destruição dos patógenos ocorre de maneira específica e programada, minimizando danos aos tecidos circundantes (Oliveira *et al.*, 2023a). Estudos demonstram a eficácia da aIFD contra várias cepas resistentes sublinhando seu potencial como uma alternativa viável aos tratamentos convencionais de antibióticos (Youssef *et al.*, 2020; Sansone *et al.*, 2022).

1.1. Doenças infecciosas e bactérias

Estamos à beira de uma crise de saúde pública sem precedentes: a era pós-antibiótica, onde infecções simples podem novamente ser fatais. Os microrganismos resistentes a antibióticos (MRA), emergiram como uma das maiores ameaças globais à saúde pública, representando um desafio que transcende fronteiras e disciplinas, exigindo ação imediata e coordenada. A evolução das bactérias, que desenvolvem rapidamente mecanismos de sobrevivência frente a tratamentos antes eficazes, exemplifica a urgência desta questão.

No centro do problema com os MRA está o gênero *Staphylococcus sp*, cujas bactérias esféricas, como o *Staphylococcus aureus*, tornaram-se protagonistas em infecções que afetam milhões de pessoas ao redor do mundo (Lima, 2015; Cristina, Paula e Rodriques, 2023). Desde sua detecção em 1880, o *S. aureus* evoluiu de um agente patogênico controlável para um adversário resistente, que hoje desafia a medicina moderna.

O início da terapia antibiótica contra *S. aureus* na década de 1930, com a sulfanilamida e, posteriormente, a penicilina, trouxe esperança (Brumfitt e Hamilton-Miller, 1989). No entanto, essa esperança foi rapidamente obscurecida pelo surgimento de cepas resistentes, alimentadas pela habilidade da bactéria de produzir betalactamase, uma enzima capaz de inativar a penicilina (Neu, 1994). A resistência antimicrobiana continuou a evoluir. Embora a meticilina tenha sido introduzida em 1960 para combater a resistência à penicilina, cepas resistentes a esse antibiótico começaram a surgir já na década de 1970.

Ainda mais alarmante foi o surgimento de cepas de *S. aureus* resistentes à vancomicina no início dos anos 2000, tanto no Brasil quanto nos Estados Unidos, Japão e Europa, evidenciando a gravidade de um problema de alcance global (Souza *et al.*, 2007; Cunha e Baiense, 2023). A cada novo antibiótico introduzido, as bactérias parecem encontrar novas formas de resistência, tornando claro que a corrida entre o desenvolvimento de medicamentos e a adaptação bacteriana é uma batalha que estamos perigosamente próximos de perder. A Figura 1 ilustra que até 2050, segundo O'Neill, 2014, o mundo deve somar cerca de 10 milhões de mortes anuais por MRA.

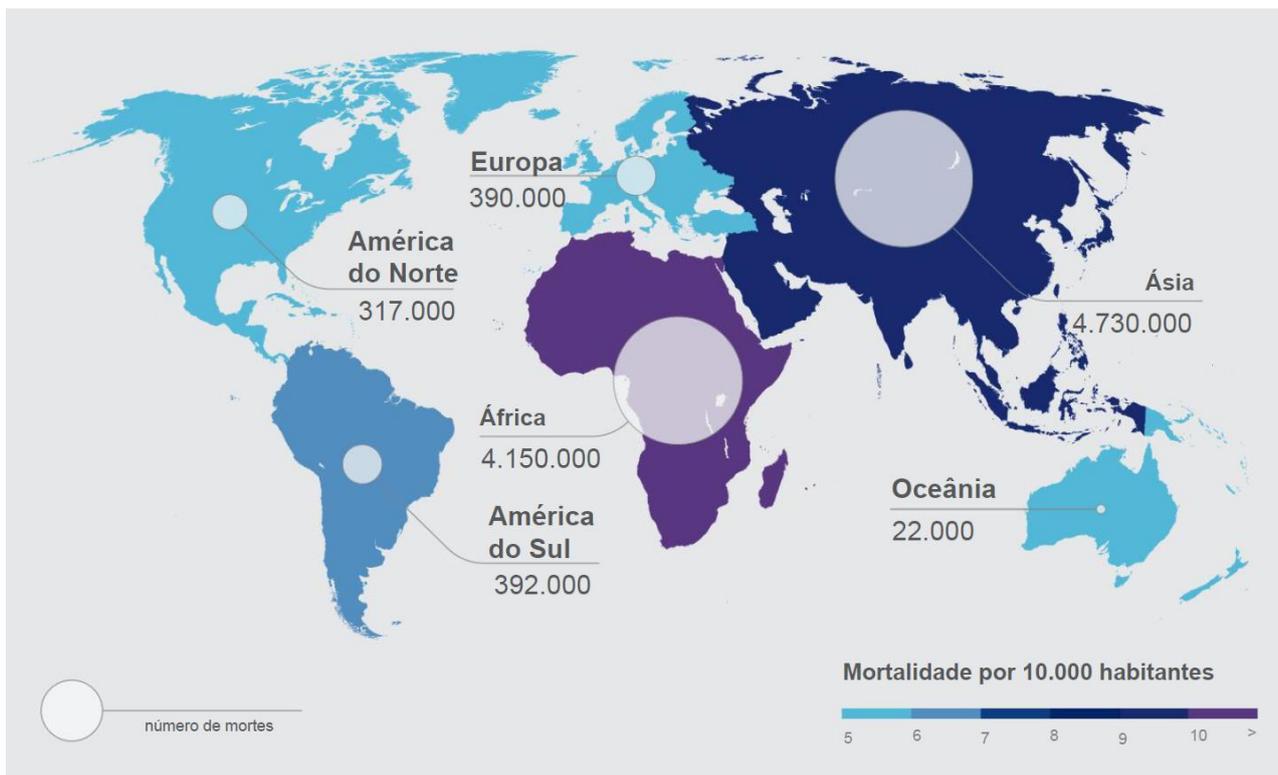


Figura 1: Esquema mundial de mortes atribuíveis a microrganismos resistentes a antibióticos todos os anos até 2050.

Fonte: Adaptado de O’Neill, 2014.

O impacto da resistência antimicrobiana vai além do *S. aureus*. A *E. coli*, um dos bacilos Gram-negativos mais prevalentes, também ilustra o quão devastador esse fenômeno pode ser. Responsável por uma variedade de doenças, desde gastroenterites a infecções extra-intestinais graves como sepse, a *E. coli* tem se tornado progressivamente mais resistente a uma gama de antibióticos. Estudos revelaram taxas assustadoras de resistência em cepas de *E. coli*, com a maioria das cepas demonstrando resistência a múltiplos antibióticos (Zhang *et al.*, 2017; Freitas e Machado, 2018; Oliveira *et al.*, 2023). A descoberta de cepas de *E. coli* resistentes à colistina na China em 2016 destaca a gravidade da situação, pois a colistina é um dos últimos recursos contra bactérias multirresistentes (Schwarz e Johnson, 2016; Huang *et al.*, 2017).

A resistência antimicrobiana é uma das ameaças mais críticas à saúde global, como alertado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2024. A resistência a medicamentos continua a aumentar, comprometendo a eficácia de tratamentos para infecções bacterianas comuns e ameaçando reverter os avanços da medicina moderna. A OMS destaca que, se medidas efetivas não forem implementadas, poderemos enfrentar até 10 milhões de mortes anuais relacionadas a infecções

resistentes até 2050, superando o impacto de muitas outras ameaças à saúde global (Figura 2) (OMS, 2023, 2024).

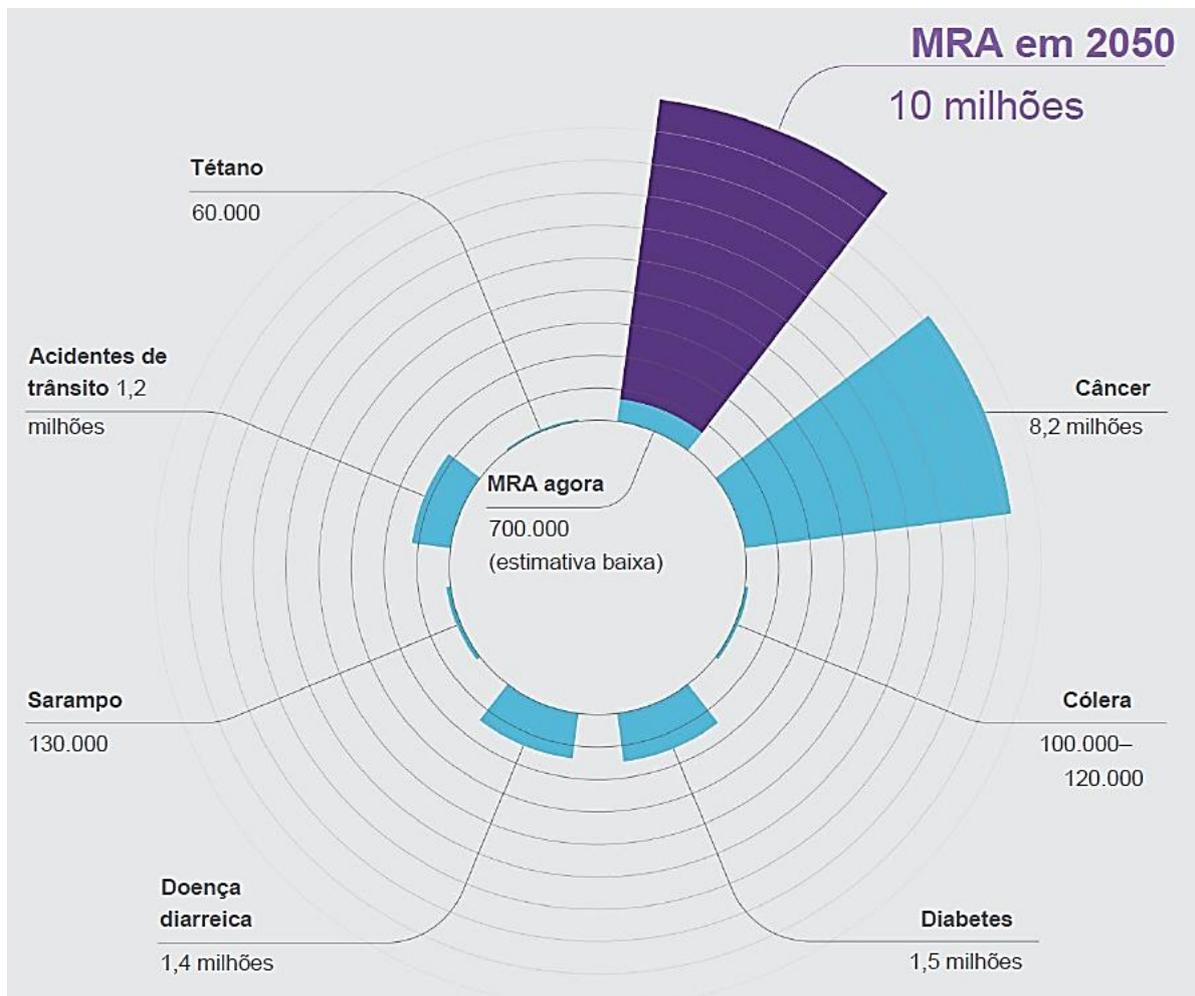


Figura 2: Mortes atribuídas a microrganismos resistentes a antibióticos todos os anos em comparação com outras causas relevantes de mortes até 2050.

Fonte: Adaptado de O’Neill, 2014.

Além das vidas perdidas, o impacto econômico será severo, com estimativas indicando que a resistência antimicrobiana poderá gerar custos de até 210 trilhões de dólares até 2050, consumindo até 1% do PIB (produto interno bruto) global (O’Neill, 2014; WHO, 2023, 2024). As infecções por bactérias resistentes, como *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*, demonstram altos níveis de resistência, forçando o uso de antibióticos de última linha, para os quais a resistência também está aumentando.

Os desafios são ampliados pela resistência em fungos, HIV, tuberculose e malária, que exigem vigilância rigorosa e inovação contínua em tratamentos. A OMS enfatiza a necessidade de uma abordagem coordenada que integre a saúde humana, animal e ambiental para enfrentar efetivamente essa crise (WHO, 2023).

Portanto, o problema da resistência antimicrobiana não é apenas uma questão de saúde, mas uma crise iminente que ameaça nossa própria existência e prosperidade. A humanidade enfrenta uma encruzilhada: ou tomamos medidas drásticas e coordenadas para enfrentar essa ameaça, ou arriscamos retornar a uma era em que infecções simples podem novamente se tornar sentenças de morte. É imperativo que governos, indústrias, cientistas e cidadãos se unam para desenvolver novas soluções, promover o uso responsável de antibióticos e investir em pesquisa para combater essa crescente ameaça. O futuro da saúde global depende das ações que tomamos agora.

1.2. Mecanismo de desenvolvimento de resistência antimicrobiana e sua transferência

A resistência antimicrobiana é um desafio global que ameaça a eficácia dos tratamentos médicos modernos, colocando em risco décadas de progresso no combate a doenças infecciosas (Castilho *et al.*, 2024). Este fenômeno é multifacetado, envolvendo uma série de mecanismos que permitem aos patógenos escapar dos efeitos dos antimicrobianos, tornando as infecções cada vez mais difíceis de tratar (Almeida *et al.*, 2023).

A resistência antimicrobiana pode ser classificada em três categorias principais: intrínseca, adaptativa e adquirida (Tenover, 2006). A resistência intrínseca refere-se a características naturais dos microrganismos, como a presença de uma barreira física que impede a penetração de antibióticos. Por exemplo, a parede celular espessa de peptidoglicano nas bactérias Gram-positivas ou a membrana externa adicional nas Gram-negativas são estruturas que conferem resistência natural a vários antibióticos, como a penicilina.

A resistência adaptativa, por sua vez, ocorre quando os microrganismos, em resposta a estímulos ambientais como estresse ou exposição a antibióticos em concentrações sub-inibitórias, sofrem mutações ou alterações na expressão genética que lhes permitem sobreviver a esses agentes. Este tipo de resistência é transitório, mas pode rapidamente evoluir para uma forma de resistência adquirida se as mudanças adaptativas forem fixadas geneticamente.

A resistência adquirida, a mais preocupante, envolve a transferência de genes de resistência entre bactérias, podendo ocorrer de maneira vertical ou horizontal (Figura 3). Na transferência

vertical, a resistência é passada de uma célula mãe para suas filhas durante a divisão celular. Já a transferência horizontal pode ocorrer por transformação, transdução ou conjugação. Por exemplo, a resistência adquirida através da conjugação é frequentemente observada em *Staphylococcus aureus*, onde plasmídeos contendo genes de resistência a múltiplos antibióticos, como a meticilina, são transferidos de uma célula para outra, resultando na disseminação de cepas multirresistentes.

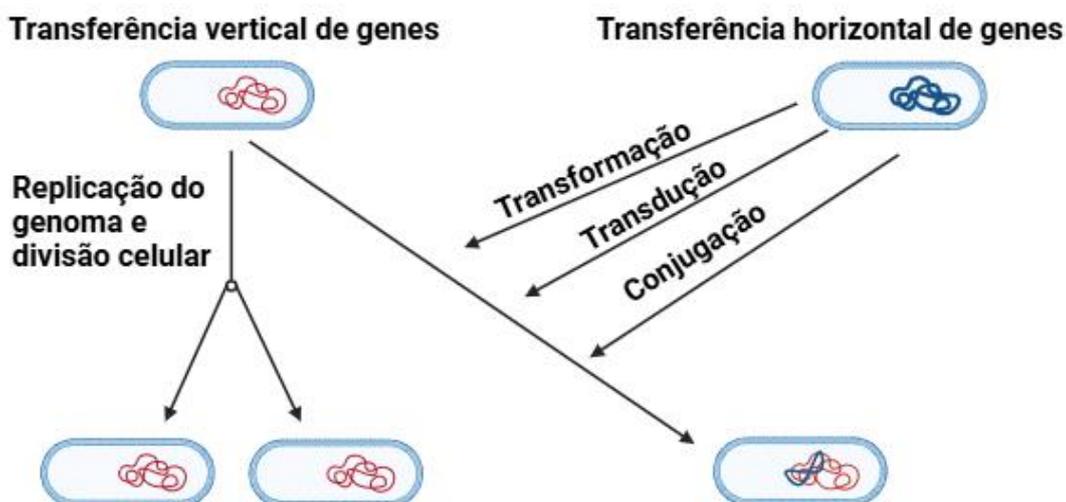


Figura 3: Esquema de transferências vertical e horizontal de genes resistentes entre bactérias.

A transferência horizontal (detalhada na Figura 4) por transformação ocorre quando bactérias com a capacidade de absorver e incorporar DNA livre no meio encontram matéria genética resistente. Já a transdução necessita de bacteriófagos, os quais são vírus que infectam bactérias. Esses agentes mediam a transferência de DNA entre bactérias, processo conhecido como transdução. Na Conjugação ocorre o surgimento de um pequeno tubo entre as duas bactérias, transferindo genomas resistentes. Esse tipo de transferência é o mais preocupante diante da sua relativa facilidade e por ocorrer entre bactérias viáveis.

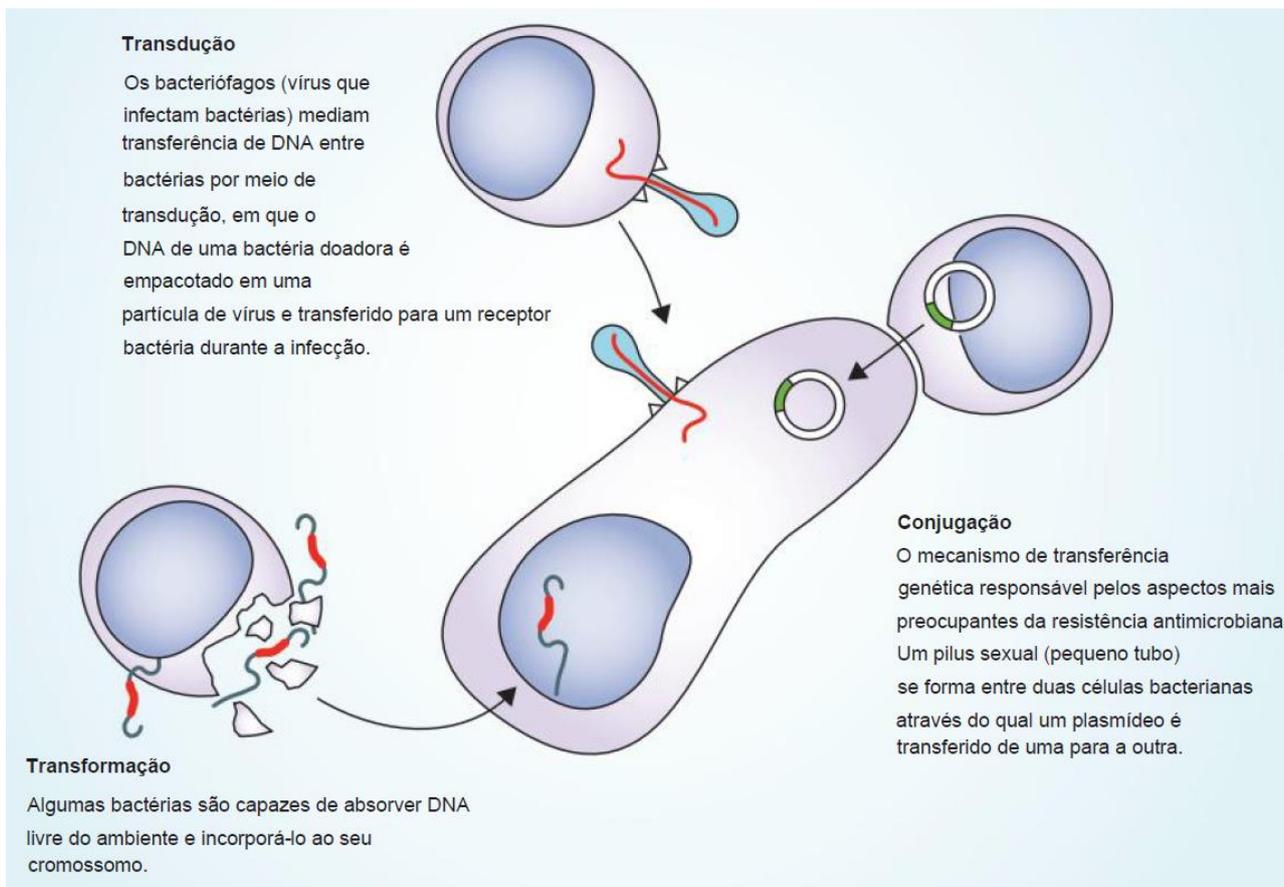


Figura 4: Esquema de transferência de genes horizontais.

Fonte: Adaptado de (Holmes *et al.* 2016).

No ambiente hospitalar, microrganismos como *Escherichia coli* e *Clostridioides difficile* estão entre os principais responsáveis por infecções associadas a procedimentos invasivos, como o uso de cateteres e ventilação mecânica. Essas infecções são particularmente problemáticas devido à presença de cepas resistentes, como as produtoras de β -lactamase de espectro estendido (ESBL), que tornam os tratamentos com antibióticos tradicionais ineficazes (Sena *et al.*, 2022).

Por outro lado, as infecções comunitárias ocorrem fora do ambiente hospitalar e são frequentemente causadas por patógenos como *Streptococcus pneumoniae*, responsável por pneumonias, ou *Staphylococcus aureus*, que pode causar infecções de pele. Em regiões onde o saneamento básico é precário, a exposição a água contaminada e alimentos mal preparados pode resultar em infecções gastrointestinais causadas por bactérias como *Salmonella* e *E. coli*, algumas das quais já demonstram resistência a tratamentos padrão, como as fluoroquinolonas (Furuya e Lowy, 2006; Cristina *et al.*, 2023).

A ligação entre os mecanismos de resistência e as infecções observadas em diferentes contextos é clara. Por exemplo, a resistência adquirida por *Staphylococcus aureus* através da conjugação permite que cepas multirresistentes se disseminem rapidamente em ambientes hospitalares, especialmente em unidades de tratamentos intensivos, onde o uso intensivo de antibióticos cria uma pressão seletiva que favorece a sobrevivência dessas cepas (Nogueira *et al.*, 2023). Da mesma forma, a resistência adaptativa em *E. coli* pode ser exacerbada pelo uso inadequado de antibióticos na comunidade, levando ao surgimento de cepas resistentes que causam infecções recorrentes do trato urinário (Patel e Levitin, 2014).

A resistência antimicrobiana representa uma ameaça iminente à saúde global, exigindo uma resposta urgente e coordenada. Dessa forma, pesquisas científicas foram desenvolvidas de modo a viabilizar tratamentos alternativos, como a terapia fotodinâmica e agentes para desinfecção de superfícies por via de inativação fotodinâmica.

1.3. Tratamentos: convencional e alternativos (inativação fotodinâmica)

Os antibióticos revolucionaram a medicina no século XX, reduzindo drasticamente a morbidade e a mortalidade por doenças infecciosas (Aminov, 2017). A descoberta da penicilina por Alexander Fleming em 1928 marcou o início da era dos antibióticos, com a produção em larga escala começando durante a Segunda Guerra Mundial (Bell, 2019). Desde então, várias classes de antibióticos foram desenvolvidas, visando diferentes componentes e processos bacterianos (Aminov, 2017). Esses medicamentos atuam inibindo a síntese de proteínas, DNA ou componentes da parede celular bacteriana, promovendo uma ampla eficácia contra patógenos, e melhoraram significativamente o tratamento de infecções, incluindo aquelas que afetam a vida íntima (Bell, 2019).

No entanto, o uso indiscriminado de antibióticos tem levado ao surgimento de resistência bacteriana, representando uma séria ameaça à saúde pública (Alves, 2021). As bactérias desenvolveram vários mecanismos de resistência, como alterar a entrada de medicamentos, degradar antibióticos ou modificar alvos de medicamentos (Alves, 2021). Para enfrentar esse desafio, os pesquisadores estão explorando novas abordagens, incluindo o uso de óleos essenciais, que se mostram promissores no combate a microrganismos resistentes com alta tolerabilidade e eficácia (Corrêa *et al.*, 2020).

A resistência a antibióticos tornou-se uma preocupação crítica de saúde global, com *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* entre os patógenos mais problemáticos (Mancuso *et al.*, 2021). *S. aureus*, particularmente as cepas resistentes à meticilina (MRSA), é uma das principais

causas de infecções nosocomiais (infecções que não estão presentes ou incubadas no momento da admissão de um paciente em uma unidade de saúde, desenvolvendo-se após 48 horas ou mais da admissão) na América Latina (Sales e Silva, 2012).

O MRSA pode ser isolado de ambientes hospitalares e profissionais de saúde, destacando o risco de transmissão para pacientes hospitalizados (Ratti e Sousa, 2009). O uso generalizado e muitas vezes inadequado de antibióticos acelerou a disseminação de bactérias resistentes, com 25-50% das administrações de antibióticos em hospitais, consideradas irregulares (Carvalho *et al.*, 2021).

Os mecanismos de resistência bacteriana incluem a modificação do antibiótico, impedindo a ação do antibiótico em seu alvo, alterando o local de ligação primário e produzindo alvos alternativos para contornar os efeitos do medicamento (Carvalho *et al.*, 2021). Essa multirresistência aumenta a morbidade, a mortalidade, o tempo de internação hospitalar e os custos de saúde, representando um desafio significativo para a saúde pública (Carvalho *et al.*, 2021).

Para infecções por *S. aureus*, especialmente MRSA, a vancomicina continua sendo uma opção crucial de tratamento intravenoso, apesar das preocupações emergentes de resistência (Cruz *et al.*, 2021). Para enfrentar a crescente ameaça da resistência aos antibióticos, abordagens inovadoras como a terapia fágica (utilização médica de vírus que infetam exclusivamente bactérias) e a medicina evolutiva estão sendo exploradas (Moreira e Rinaldi Neto, 2024). À medida que a resistência aos antibióticos continua a evoluir, abordagens multidisciplinares e novas estratégias terapêuticas serão cruciais no combate a esse desafio de saúde global (Moreira e Rinaldi Neto, 2024).

A crise de resistência aos antibióticos impulsiona a busca por novas abordagens terapêuticas para combater infecções bacterianas (Moreira e Neto, 2024). A terapia fototérmica e a inativação fotodinâmica antimicrobiana (aIFD) emergem como uma alternativa promissora (a Figura 5 ilustra a quantidade de publicações sobre os assuntos desde 2000). A aIFD atua utilizando um fotossensibilizador (FS), luz e oxigênio molecular (O_2) para gerar Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) capazes de inativar microrganismos (Melo e Perussi, 2012a), já os processos fototérmicos envolvem a utilização de FS e luz para promover o aquecimento do FS e conseqüentemente aquecendo ao seu redor levando a danos celulares por hipertermia (Macneill *et al.*, 2013).

FSs de origem natural, como curcumina, clorina e riboflavina, têm demonstrado eficácia contra bactérias resistentes, com excelente biocompatibilidade (Vilaça *et al.*, 2023a). A nanotecnologia desempenha um papel crucial, oferecendo sistemas de entrega que melhoram a eficiência terapêutica ao aumentar a internalização dos FSs nas células microbianas (Garapati *et al.*, 2023). Essas abordagens inovadoras apresentam vantagens significativas, como a ausência de

desenvolvimento de resistência bacteriana, tornando-as ferramentas valiosas no combate às infecções resistentes aos antibióticos convencionais (Melo e Perussi, 2012a; Vilaça *et al.*, 2023a).

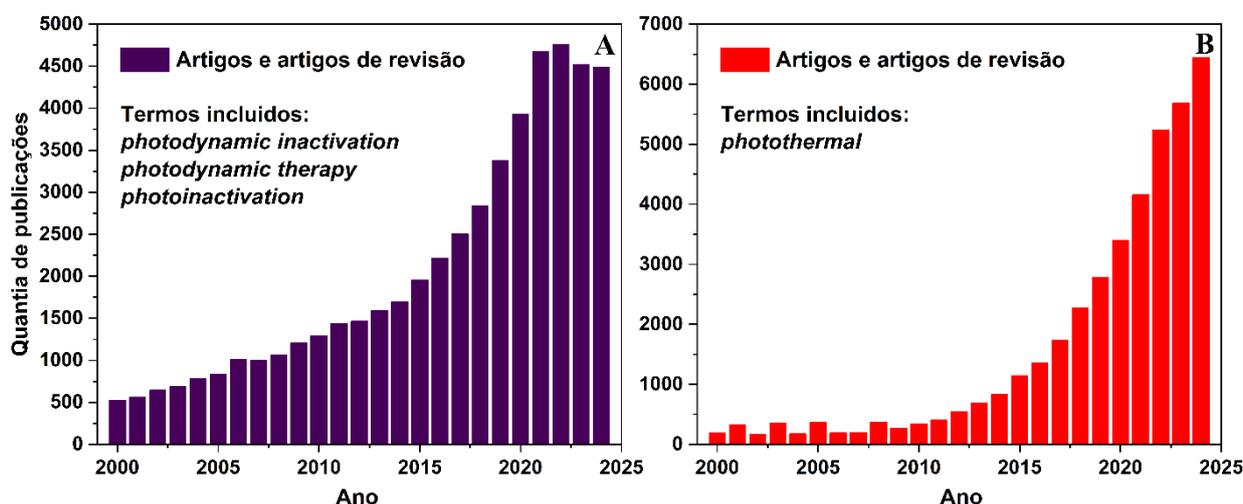


Figura 5: Ilustração da quantia de publicações com os termos: (A) *photodynamic inactivation* ou, *photodynamic therapy* ou *photoinactivation* e (B) *photothermal*.

Fonte: *Web of science*, 2024.

A Figura 5A mostra que, desde o ano 2000, o número de publicações contendo os termos *photodynamic inactivation* (inativação fotodinâmica), *photodynamic therapy* (terapia fotodinâmica) ou *photoinactivation* (fotoinativação) apresentou um aumento significativo (*Web of science*, 2024). O crescimento na Figura 5A atingiu um ápice em 2021 e 2022, anos marcados pela pandemia de COVID-19, chegando a ser quase dez vezes maior em comparação ao número de publicações de 2000. Já a Figura 5B evidencia que as pesquisas envolvendo o termo *photothermal* (fototérmico) exibem um crescimento exponencial desde 2010, ultrapassando, desde 2022, as publicações relacionadas aos outros três temas mencionados (*Web of science*, 2024). Esses dados sugerem que os processos fotodinâmicos continuam desempenhando um papel de destaque nas tecnologias emergentes, enquanto os processos fototérmicos, ainda em fase de expansão, têm potencial para alcançar um impacto igualmente significativo.

A terapia fotodinâmica (TFD) emerge como uma solução inovadora e promissora (Lima *et al.*, 2022; Caires *et al.*, 2023; Gholami *et al.*, 2023). A TFD baseia-se na interação entre luz, um FS não-tóxico e oxigênio, resultando em EROs capazes de inviabilizar célula. Este processo ocorre por meio de dois mecanismos principais. O primeiro, conhecido como Mecanismo Tipo I, envolve a transferência de elétrons do FS excitado para o O₂, gerando íons-radicaais que oxidam os componentes

celulares do alvo, culminando em necrose. Simplificando, o Tipo I provoca danos diretos às células (Ribeiro e Jorge, 2005).

O segundo mecanismo da TFD, Tipo II, utiliza a transferência de energia do FS excitado para o O₂, produzindo oxigênio singleto (¹O₂), altamente citotóxico, que induz a apoptose, um processo de morte celular programada que evita danos aos tecidos adjacentes. Em termos simples, o Tipo II utiliza uma forma especial de oxigênio para eliminar as células controladamente, sem causar lesões aos tecidos circundantes (Ribeiro e Jorge, 2005).

A TFD tem sido amplamente aplicada em países desenvolvidos, e suas aplicações clínicas são diversas. Inicialmente desenvolvida para tratar diferentes tipos de câncer, como o câncer de pulmão e esôfago, a TFD também se mostrou eficaz em condições como psoríase, degeneração macular da retina, doenças autoimunes, e infecções bacterianas resistentes a antibióticos. Especificamente, a TFD é usada com sucesso no tratamento de carcinomas basocelulares, uma forma comum de câncer de pele, e na remoção de verrugas na laringe, demonstrando sua versatilidade e eficácia (Felício *et al.*, 2008; Setlik e Silva, 2016; Silva *et al.*, 2021).

Os FSs desempenham um papel central na TFD. A primeira geração de FSs, derivada de porfirinas, embora eficaz no tratamento de tumores, apresentava limitações significativas, como a fotossensibilização prolongada da pele e a baixa penetração nos tecidos (O'Connor, Gallagher e Byrne, 2009). Esses desafios impulsionaram o desenvolvimento da segunda geração de FSs, que incluem compostos como clorinas e ftalocianinas (Mironov, 1996; Senge e Brandt, 2011; Bissani *et al.*, 2024). Estes novos FSs possuem maior absorção em comprimentos de onda que permitem uma penetração mais profunda nos tecidos, menor toxicidade na ausência de luz e maior especificidade na acumulação nos tecidos-alvo. Além disso, a introdução de nanopartículas (NPs) como FSs representa um salto tecnológico significativo na TFD (Usacheva *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2018; Rani *et al.*, 2020; Caires *et al.*, 2023). As NPs permitem uma maior penetração celular e melhoram a especificidade tumoral, superando as limitações dos FSs convencionais.

A aIFD tem ganhado destaque devido à sua eficácia contra uma ampla gama de bactérias, incluindo cepas multirresistentes (Oliveira *et al.*, 2023b). O mecanismo de ação da aIFD, que envolve múltiplos sítios nos microrganismos, torna improvável o desenvolvimento de resistência, uma vantagem significativa em comparação com os antibióticos tradicionais (Figura 6 demonstra os locais da ação do antibiótico frente a ação multissítios de FSs) (Perussi, 2007; Melo e Perussi, 2012). Estudos demonstram a eficácia da aIFD em cepas como *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*,

Pseudomonas aeruginosa, entre outras, mostrando inativações completas em muitos casos (Kashef *et al.*, 2017; Caires *et al.*, 2020; Sheng *et al.*, 2022).

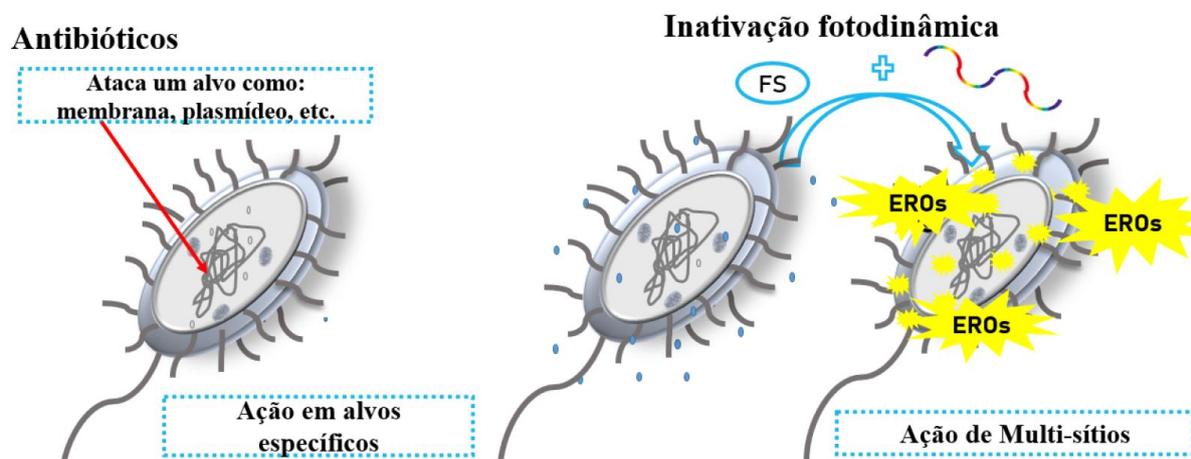


Figura 6: Ação multissítios da inativação fotodinâmica (tratamento alternativo) frente à ação localizada dos antibióticos (tratamento convencional).

Fonte: Lima, 2023.

Contudo, a aplicação da aIFD enfrenta desafios, principalmente relacionados à permeabilização do FS nas membranas celulares das bactérias. A estrutura das bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, que possuem diferenças significativas na composição de suas membranas, pode dificultar a entrada do FS (Beveridge, 2001). Para superar essa barreira, pesquisadores têm utilizado compostos auxiliares como Dimetilsulfóxido (DMSO) até 5% e desenvolvido novas classes de FSs baseados em NPs, que possuem elevada capacidade de penetração celular devido às suas dimensões reduzidas (Wang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013; Farjami *et al.*, 2021).

Em um mundo cada vez mais ameaçado pela resistência antimicrobiana, a TFD e a aIFD não apenas oferecem uma nova esperança, mas também pavimentam o caminho para uma revolução terapêutica indispensável na luta contra microrganismos resistentes. Com os avanços contínuos em nanotecnologia e o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores, a TFD e a aIFD têm o potencial de se tornarem pilares fundamentais no combate a infecções, redefinindo o futuro da medicina, onde o desenvolvimento e descobertas de moléculas para uso em aIFD será crucial.

1.4. Moléculas de Interesse em aIFD

Embora a TFD tenha raízes que datam de mais de um século, sua aplicação para a inativação de bactérias só foi reconhecida em 1960 com o uso do azul de toluidina como FS (Tappeiner, 1903; Ackroyd *et al.*, 2001; Allison e Sibata, 2010). Desde então, o campo da TFD tem evoluído significativamente, com a descoberta e desenvolvimento de uma variedade de moléculas naturais e sintéticas para a aIFD de diversas cepas bacterianas (Vilaça *et al.*, 2023).

De maneira geral, os fotossensibilizadores usados em aIFD são classificados em dois grandes grupos: porfirinóides e não porfirinóides (Ormond e Freeman, 2013). Os porfirinóides, que incluem compostos como a porfirina, clorina, feoforbida e ftalocianina, são amplamente utilizados devido à sua excelente capacidade de absorver luz e gerar EROs. Estes compostos têm demonstrado eficácia em várias aplicações clínicas devido à sua estabilidade e a capacidade de gerar danos significativos às células-alvo (Ormond e Freeman, 2013). Em contraste, os fotossensibilizadores não porfirinóides, como a eosina, o azul de toluidina, a hipericina e a curcumina, são valorizados por suas propriedades únicas, como menor toxicidade para tecidos saudáveis e eficácia em diferentes tipos de tratamento (Ormond e Freeman, 2013).

O Diagrama de Jablonski, ilustrado na Figura 7, fornece uma visão clara das transições energéticas que ocorrem quando um FS absorve luz. Este diagrama mostra como os elétrons no FS são excitados para um estado energético elevado, conhecido como estado singleto excitado. A partir deste estado, várias transições podem ocorrer, incluindo fluorescência, conversão interna (CI) e cruzamento de intersistema (Soini *et al.*, 1987; Berezin e Achilefu, 2010; Cugnasca e Santos, 2021). O cruzamento intersistema pode levar à transferência de elétrons para o oxigênio molecular, gerando EROs, um mecanismo conhecido como Tipo I.

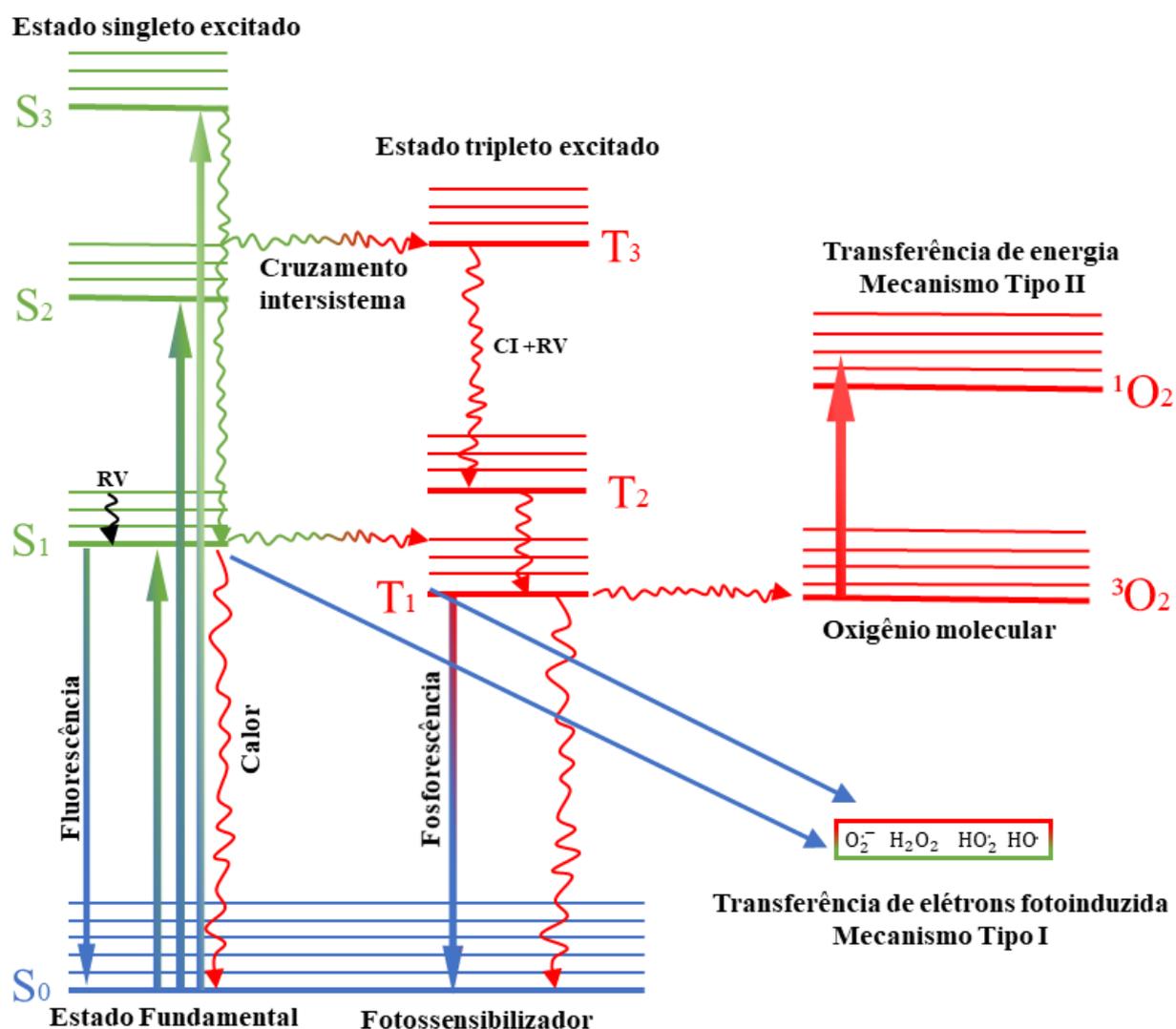


Figura 7: Diagrama de Jablonski simplificado. RV – Relaxação vibracional, CI – conversão interna, 1O_2 – oxigênio singlete (estado excitado) e 3O_2 – oxigênio tripleto (estado fundamental do oxigênio molecular).

O mecanismo Tipo I envolve a formação de radicais livres que causam oxidação direta dos componentes celulares, enquanto o mecanismo Tipo II se baseia na produção de 1O_2 , uma forma altamente reativa de oxigênio que induz danos significativos às estruturas celulares das bactérias. Ambos os mecanismos são eficazes na inativação de bactérias e contribuem para a eficácia da TFD sem gerar resistência antimicrobiana.

A nanotecnologia desempenha um papel crucial na melhoria da eficácia da aIFD. NPs, como as de ouro e óxido de grafeno, têm mostrado grande potencial em melhorar a penetração dos FSs nas células bacterianas, superando barreiras como a espessa parede celular das bactérias Gram-positivas

e a dupla camada lipídica das Gram-negativas. Essas NPs podem ser projetadas para aprimorar a entrega e a eficácia dos FSs. Elas podem encapsular FSs hidrofóbicos, tornando-os solúveis, ou transportar antibióticos conjugados a FSs, combinando a ação antibiótica com os efeitos da aIFD, representando um avanço significativo (Blecher *et al.*, 2011; Zong *et al.*, 2022).

Portanto, o contínuo avanço na nanotecnologia e o desenvolvimento de novos fotossensibilizadores são essenciais para expandir as aplicações clínicas da TFD e aIFD. Esses avanços prometem melhorar significativamente o combate a infecções bacterianas e superar a resistência antimicrobiana, oferecendo novas esperanças para tratamentos mais eficazes e menos suscetíveis a resistência. Toda via, o FS precisa receber irradiação para atingir os estados excitados e dar início aos processos de geração de EROs e $^1\text{O}_2$, assim a fonte de luz se torna um fator crucial na TFD e aIFD.

1.5. Fontes de Luz

Na aIFD, a escolha da fonte de luz é um fator crítico que pode determinar o sucesso do tratamento, influenciando diretamente a eficácia e a segurança da terapia (Henderson e Dougherty, 1992). As fontes de luz utilizadas na TFD podem ser agrupadas em três grandes categorias: lâmpadas de amplo espectro (halógenas), diodos emissores de luz (do inglês: *light emitting diodes* – LEDs) e lasers (acrônimo inglês para *light amplification by stimulated emission of radiation*, que em português significa: amplificação de luz por emissão estimulada de radiação). Cada uma dessas fontes possui características distintas que afetam seu desempenho e aplicabilidade clínica.

As lâmpadas halógenas foram pioneiras na TFD, oferecendo uma faixa ampla de comprimentos de onda (Dougherty *et al.*, 1998). Essas lâmpadas emitem luz policromática e não coerente, cobrindo uma grande variedade de espectros de emissão. Apesar de seu espectro abrangente, o uso das lâmpadas halógenas é limitado pela significativa geração de calor, o que pode provocar desconforto e possíveis danos aos tecidos saudáveis. Esse fator térmico torna a aplicação das lâmpadas halógenas menos ideal em áreas sensíveis e em tratamentos que exigem alta precisão.

Os LEDs têm se destacado como uma escolha preferencial na TFD devido à sua capacidade de emitir luz em comprimentos de onda específicos e com alta intensidade. Eles são conhecidos por sua eficiência energética e baixa geração de calor, proporcionando um tratamento mais confortável e seguro para os pacientes. Os LEDs permitem a seleção precisa do comprimento de onda necessário para ativar diversos fotossensibilizadores, tornando a terapia mais direcionada e eficaz. Na prática clínica, os LEDs são frequentemente utilizados em tratamentos dermatológicos, como para acne

(doença das glândulas sebáceas) e psoríase (doença autoimune caracterizada por manchas na pele avermelhadas, pruriginosas e escamosas), devido à sua capacidade de minimizar efeitos adversos enquanto oferecem bons resultados terapêuticos (Barolet, 2008; Issa e Manela-Azulay, 2010; Barreto, 2023).

Os lasers são altamente valorizados na TFD pela sua precisão e controle na emissão de luz. Eles produzem luz coerente e unidimensional em um comprimento de onda específico, permitindo a focalização em áreas muito pequenas e oferecendo a maior precisão no tratamento. Os lasers são especialmente úteis para terapias direcionadas, como em tumores cutâneos e tratamentos de tecidos profundos. O desenvolvimento de lasers de diodo com maior precisão e potência está expandindo suas aplicações clínicas, melhorando a eficácia e possibilitando tratamentos mais personalizados (Catorze, 2009; Oliveira e Machado, 2023).

Os avanços tecnológicos têm proporcionado melhorias significativas em cada tipo de fonte de luz utilizada na TFD. A introdução de LEDs de múltiplas cores e lasers com maior precisão amplia as possibilidades de personalização dos tratamentos. Essas inovações não apenas melhoram a eficácia dos tratamentos, mas também ajudam a reduzir os efeitos colaterais e a melhorar a experiência do paciente (Lima *et al.*, 2021).

A escolha adequada da fonte de luz na TFD é crucial para maximizar os resultados terapêuticos e minimizar os efeitos adversos. Com os avanços contínuos na tecnologia de fontes de luz, a TFD está se tornando cada vez mais eficiente e adaptada às necessidades específicas dos pacientes, prometendo revolucionar ainda mais a eficácia desta abordagem inovadora.

Uma classe de FS capaz de amplos espectros de absorção, capacidade de emissão no infravermelho além de terem suas janelas ópticas ajustáveis por controles nos processos de fabricação são as NPs semicondutoras que se mostram promissoras na TFD.

1.6. Mecanismo de ação de nanopartículas semicondutoras

As NPs semicondutoras emergem como ferramentas inovadoras na TFD, oferecendo estratégias avançadas para a inativação de microrganismos. Suas propriedades fotodinâmicas únicas são fundamentais para o desenvolvimento de novas abordagens no combate a infecções e na superação da resistência antimicrobiana.

Semicondutores são materiais cujas bandas de condução e de valência são separadas por uma lacuna de energia, conhecida como "gap" (Duboz, 1999). Esse gap de energia é crucial para determinar a faixa de comprimento de onda da luz que o semicondutor pode absorver (Duboz, 1999;

Chen *et al.*, 2013; Zanatta, 2019). Semicondutores com um gap maior necessitam de luz com maior energia, como a luz ultravioleta, para serem ativados, enquanto aqueles com um gap menor podem ser excitados por luz visível (Duboz, 1999). A eficiência na geração de EROs e, conseqüentemente, na inativação bacteriana é diretamente influenciada por essa característica.

Quando a luz com energia suficiente incide sobre um semicondutor, ela excita os elétrons da banda de valência para a banda de condução, criando pares de elétrons livres e lacunas de elétrons. Esses elétrons livres podem interagir com o oxigênio molecular presente no meio, gerando radicais reativos como o ânion superóxido (O_2^-) e o radical hidroxila ($\cdot OH$). Esses radicais são extremamente reativos e podem causar danos significativos às membranas celulares, proteínas e ácidos nucleicos das bactérias, resultando em sua destruição. Abaixo temos alguns semicondutores e suas aplicações:

- Nitrato de Carbono Grafítico ($g-C_3N_4$): Este semicondutor é notável por seu gap de 2,4 eV, permitindo o uso de luz visível para a geração de EROs. Estudos demonstraram que o $g-C_3N_4$ é eficaz na inativação de *E. coli* quando exposto à luz de 465 nm por 60 minutos, destacando sua capacidade para aplicações práticas em TFD. Alguns semicondutores empregados para aIFD são:

- Dióxido de Titânio (TiO_2) dopado com Cobre: Conhecido por sua estabilidade e eficácia em ambientes aquosos, o TiO_2 dopado com cobre utiliza luz visível para promover fotorredução e foto-oxidação. Esse material tem mostrado eficácia na geração de EROs, ampliando seu potencial para aplicações em inativação bacteriana (Rychtowski *et al.*, 2022).

- Nanopartículas de Polímeros Conjugados (PCs): Estas NPs semicondutoras proporcionam a indução simultânea de dois efeitos sob iluminação: a geração de EROs (efeito fotodinâmico) e a geração de calor (efeito fototérmico) (Rychtowski *et al.*, 2022). A combinação desses efeitos pode ser aplicada para fotoinativar bactérias de forma sinérgica, aumentando a eficácia das terapias.

A nanotecnologia baseada em NPs semicondutoras está na vanguarda da inovação em TFD. A exploração das propriedades fotodinâmicas dessas NPs não só aprimora as técnicas de inativação de microrganismos, mas também abre novas possibilidades para enfrentar a resistência antimicrobiana e expandir as aplicações clínicas. O avanço contínuo nesta área é essencial para o desenvolvimento de novas soluções terapêuticas e para a ampliação das opções de tratamento.

Existe ainda uma classe de semicondutores que possuem características ópticas interessantes, que vão desde absorção e emissão intrínsecas até a adaptação das janelas ópticas com o controle de seu band gap. Os PCs ficam na vanguarda das tecnologias opticoelétricas.

1.7. Polímeros conjugados

Os PCs são uma classe de materiais que se destacam por suas propriedades ópticas e elétricas excepcionais, posicionando-os na vanguarda da inovação em diversos setores. A estrutura π -conjugada, caracterizada por ligações alternadas simples (σ) e duplas (π) entre os átomos de carbono, confere aos PCs uma ampla gama de aplicações tecnológicas e biológicas (Moliton e Hiorns, 2004; Tuncel, 2019). Essa conjugação permite uma mobilidade eletrônica significativa e influência diretamente suas propriedades ópticas e elétricas.

A estrutura π -conjugada dos PCs é formada por orbitais π sobrepostos ao longo de uma cadeia de átomos de carbono, resultando em um sistema de ligações duplas alternadas. Essa estrutura permite a delocalização dos elétrons, afetando as propriedades ópticas e elétricas do polímero (Moliton e Hiorns, 2004; Tuncel, 2019). A capacidade dos PCs de absorver e emitir luz é diretamente relacionada ao band gap (gap de energia) entre a banda de valência e a banda de condução (Tuncel, 2019). Semicondutores com um band gap apropriado podem absorver luz visível e emitir luz quando os elétrons retornam ao seu estado fundamental.

Nos campos biológico e de saúde, os PCs solúveis em água são particularmente valiosos devido à sua capacidade de interagir com ambientes biológicos (Campbell *et al.*, 1994; Kahya, 2019; Volarić *et al.*, 2021). Estes PCs frequentemente possuem cadeias laterais carregadas, como grupos catiônicos de amônio quaternário, grupos carboxila aniônicos, grupos sulfônicos e grupos fosfato (Kahya, 2019; Volarić *et al.*, 2021). Suas aplicações incluem:

- Diagnóstico e Imagem Fluorescente: Facilitam visualizar tecidos e células com alta precisão, destacando áreas de interesse para análise (Yukawa e Baba, 2017; Peris-Fajarnés *et al.*, 2018).
- Monitoramento e Entrega de Drogas: Utilizados para rastreamento e liberação controlada de fármacos, permitindo uma abordagem mais eficaz na administração de medicamentos (Laviña *et al.*, 2004; Neves *et al.*, 2022).
- Terapias Antimicrobianas e Anticâncer: Aplicados na luta contra infecções e câncer, aproveitando suas propriedades bioativas e fotodinâmicas (Sharma *et al.*, 2012).

A produção de NPs de polímeros conjugados (PC-NPs) que podem ser dispersas em água representa uma inovação significativa (Kang *et al.*, 2022). Estas NPs podem ser funcionalizadas para melhorar a entrega de fármacos ou criar agentes de imagem fluorescentes altamente eficientes (Feng *et al.*, 2013). Assim, a capacidade de dispersão em água amplia suas aplicações em ciências da vida.

Sendo a baixa solubilidade ou completa hidrofobicidade dos PC sua principal barreira para aplicações biológicas, pois desde infecções de superfícies a tratamentos de inativação fotodinâmicas

envolveriam meios aquosos para serem ministrados, dessa forma pesquisadores desenvolveram técnicas para tornar os PC solúveis em água, uma técnica se destaca, a fabricação de NPs de PC apresenta variedades de polímeros empregados e possibilita seleção da janela óptica durante o processo de fabricação das NPs (Oliveira *et al.*, 2018; Rabadan, 2020a).

1.8. Nanopartículas de polímeros conjugados

Os PCs são notáveis por suas propriedades ópticas e elétricas excepcionais, o que os torna valiosos em diversas aplicações, incluindo optoeletrônica e biomedicina (Silva, 2010; Soliman *et al.*, 2020). No entanto, a limitação de solubilidade em água tem sido um desafio significativo para sua aplicação em sistemas aquosos, como fototerapia, entrega de fármacos, biossensores (*e.g.* diagnósticos médicos e veterinários), descontaminação ambiental (*e.g.* tratamento de águas), cosméticos e cuidados pessoais (Yadav *et al.*, 2022). Para superar essa limitação, pesquisadores têm se empenhado no desenvolvimento de NPs de polímeros conjugados (PC-NPs), que visam aproveitar as propriedades dos PCs enquanto resolvem problemas de solubilidade (Yadav *et al.*, 2022).

A síntese de PC-NPs pode ser realizada por diversos métodos, entre os quais se destacam a polimerização por nanoemulsão e a nanoprecipitação (Puig, 1999; Pulingam *et al.*, 2022). A polimerização por nanoemulsão envolve uma solução coloidal com a dissolução do PC em um solvente orgânico imiscível em água, sendo então misturado com uma solução aquosa contendo surfactantes. A homogeneização das NPs é obtida por forças de cisalhamento e agitação até a evaporação do solvente. Essa técnica é amplamente utilizada por sua capacidade de produzir NPs com morfologias bem definidas, mas pode exigir um controle rigoroso dos solventes e surfactantes para evitar aglomeração ou formação de partículas não desejadas (Rabadan, 2020a; Neves *et al.*, 2022; Pulingam *et al.*, 2022; Lima, 2023).

A nanoprecipitação, por sua vez, usa uma matriz de molécula anfifílica ou copolímero. Nessa técnica, prepara-se uma solução de PC em um solvente orgânico e uma solução contendo a molécula anfifílica e água. A solução de PC é adicionada à solução aquosa, muitas vezes por gotejamento, e a mistura é agitada vigorosamente. Embora seja um método mais simples e econômico, a eficácia da nanoprecipitação depende da escolha precisa do copolímero para alcançar o tamanho e a forma desejados das NPs. A principal diferença entre as duas técnicas ocorre, já que a nanoemulsão se trata de uma dispersão de duas fases (líquido-líquido), enquanto a nanoprecipitação é um processo de formação de NPs a partir de materiais solúveis (Li *et al.*, 2013; Rabadan, 2020a; Neves *et al.*, 2022; Pulingam *et al.*, 2022; Lima, 2023).

Entre os estudos significativos, destaca-se o trabalho de Zhang *et al.* (2020), que sintetizou NPs denominadas DMCNPs a partir dos polímeros dicetopirrolpirrol-tienotiofeno (PDPPTT) e o fotossensibilizador poli[2-metoxi-5-((2-ethylhexil)oxi)-p-fenilenevinileno] (MEH-PPV) na presença de poli(estireno-co-anidrido maleico). Essas DMCNPs não apenas geram EROs e liberam calor durante a irradiação, mas também mostraram eficácia na inativação de cepas de *E. coli* resistente a ampicilina em diferentes condições de irradiação (Zhang *et al.*, 2020). A combinação dos efeitos fotodinâmicos e fototérmicos oferece uma abordagem promissora para combater infecções bacterianas resistentes.

Outro relevante exemplo é o trabalho de Facchinatto *et al.* (2022) que demonstrou que nanocompósitos de quitosana/Cn-PPV exibem atividades antimicrobianas e fotoantimicrobianas significativas, gerando EROs sob iluminação azul, contribuindo para um efeito fotobactericida notável. A combinação de quitosana com o Cn-PPV (cujo monômero é representado na Figura 8), juntamente com uma distribuição de tamanho nanométrico e uma superfície carregada positivamente, resulta em um desempenho bactericida elevado, especialmente contra *E. coli* e *S. aureus*.

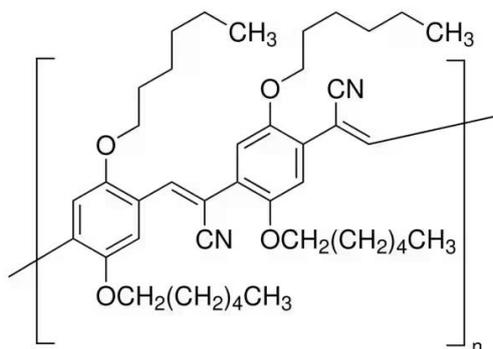


Figura 8: Representação do monômero do polímero conjugado Cn-PPV.

Outra pesquisa, realizada por Kemal *et al.* (2017), envolveu Cn-PPV-NPs com a matriz copolímero poly(ethylene glycol)methylether-block-poly(lactide-co-glycolide) (PEG-PLGA), com dimensões na ordem de 100 nm, que apresentaram fluorescência no infravermelho próximo (emissão de um pico estreito em 700 nm), dessa forma possibilitando a obtenção de imagens no infravermelho próximo (janela óptica com maior penetração na pele humana) (Kemal *et al.*, 2017; Caires *et al.*, 2023).

Outro protótipo relevante é o polímero conjugado poly[2,6-(4,4-bis-(2-ethylhexyl)-4H-cyclopenta[2,1-b;3,4-b']-dithiophene)-alt-4,7-(2,1,3-benzothiadiazole)] (PCPDTBT – monômero

representado na Figura 9). Embora o PCPDTBT apresente uma ampla janela de absorção na região visível da luz, sua solubilidade em água é limitada. Para contornar essa limitação, pesquisadores desenvolveram NPs de PCPDTBT (PCPDTBT-NPs).

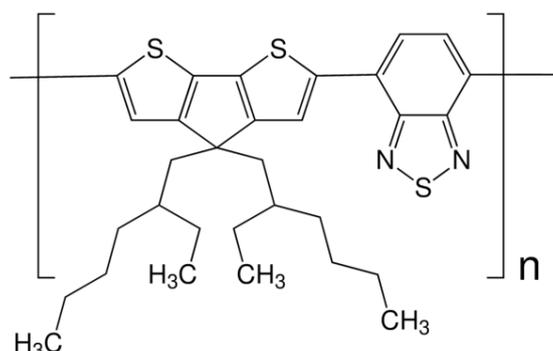


Figura 9: Representação do monômero do polímero conjugado PCPDTBT.

As PCPDTBT-NPs foram sintetizadas utilizando matrizes como o 1,2-dioctanoyl-sn-glicero-3-phosphocholine (DOPC) e 1,2-dioctanoyl-sn-glicero-3-phosphoethanolamine (DOPE). Essas NPs demonstraram não apenas um efeito fototérmico significativo em células HeLa, mas também potencial como agentes fluorescentes para o monitoramento celular, sendo classificadas como materiais teranósticos (Du *et al.*, 2021).

As PCPDTBT-NPs foram estudadas quanto à capacidade de regeneração celular em células *Hydra vulgaris* e na alteração da dinâmica de proliferação de queranócitos. Os resultados mostraram que essas NPs têm uma capacidade regenerativa significativa tanto na ausência quanto na presença de irradiação com luz branca (densidade de energia de 0,124 mW mm⁻² por 24 horas) (Onorato *et al.*, 2022). No entanto, também foram observados estresses oxidativos nas células e uma redução na migração dos queranócitos sob irradiação.

Um estudo realizado na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) demonstrou que as NPs de PCPDTBT foram obtidas por meio de nanoprecipitação. O PCPDTBT foi dissolvido em tetrahydrofurano (THF) a uma concentração de 0,23 mg mL⁻¹, e a solução resultante foi adicionada lentamente a uma solução aquosa de polissorbato 20 (*Tween* 20) com concentração de 1,2% (Caires *et al.*, 2024).

O estudo de Caires *et al.* (2024) realizou testes *in vitro*, utilizando PCPDTBT-NPs na concentração de 17 µg mL⁻¹, com uma dose de radiação de 250 J cm⁻². Observou-se uma redução de 97% em UFC mL⁻¹ para a cepa de *E. coli*, enquanto a cepa resistente *E. coli mcr⁻¹* (gene responsável por modificar a estrutura da membrana bacteriana, tornando-a menos suscetível à ação do antibiótico

colistina) apresentou uma redução de 83%. As NPs produzidas por Caires *et al.* (2024) mostraram um diâmetro hidrodinâmico médio de 185 ± 77 nm, refletindo seu tamanho em solução. As imagens de MEV revelaram um diâmetro médio de 122 ± 45 nm, evidenciando suas dimensões geométricas e a regularidade de suas formas esféricas. Além disso, as NPs demonstraram estabilidade tanto sob luz quanto em condições de armazenamento. (Caires *et al.*, 2024).

Os estudos de Du *et al.* (2021), Onorato *et al.* (2022) e de Caires *et al.* (2024) sugerem que as NPs de PCPDTBT são fotossensibilizadores promissores para a inativação fotodinâmica e fototérmica de bactérias multirresistentes. Essa abordagem representa um avanço significativo no combate a infecções bacterianas resistentes a múltiplos medicamentos, oferecendo uma alternativa inovadora às terapias convencionais. As perspectivas futuras incluem o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e seguros, ampliando o uso de NPs em aplicações biomédicas e em terapias fotodinâmicas.

As NPs de PCs representam um avanço significativo na aplicação de PCs em sistemas aquosos. Sua capacidade de absorver e emitir luz, resultando em propriedades fotônicas e teranósticas, pode transformar tratamentos, diagnósticos, desinfecções de ambientes e superfícies, além de possibilitar mitigar impactos ambientais. O contínuo desenvolvimento e investigação dessas NPs são cruciais para maximizar seu potencial terapêutico e expandir suas aplicações clínicas.

Assim, o presente trabalho buscou combinar as propriedades complementares das NPs dos polímeros conjugados Cn-PPV e PCPDTBT em uma única e nova estrutura nanoencapsulada, denominada Cn-TBT-NPs. Essa abordagem permitiu explorar os potenciais desses materiais na aplicação de fotoinativação bacteriana, integrando suas características em um sistema otimizado. Para alcançar esse objetivo, foram definidos os seguintes propósitos gerais.

2. Objetivo geral

Formar e caracterizar micelas, NPs híbridas combinando os polímeros conjugados Cn-PPV e PCPDTBT, com foco na aplicação de fotoinativação de bactérias sob irradiação na faixa do visível com sistema de LED RGB via inativação fotodinâmica e sob a irradiação infravermelha (806 nm) por meio da inativação fototérmica.

2.1. Objetivos específicos

- **Gerar NPs:** Gerar micelas de PCPDTBT e Cn-PPV resultando em Cn-TBT, e com o método de nanoprecipitação, obter novas estruturas nanoparticuladas, denominadas Cn-TBT-NPs.

- **Caracterização Óptica:** Analisar as propriedades ópticas das NPs por meio de espectroscopia de absorção UV-visível, fluorescência e tempo de vida fluorescente.
- **Determinação do tamanho e estabilidade:** Medir o diâmetro hidrodinâmico das NPs usando espectroscopia de espalhamento dinâmico de luz (EDL) e avaliar a estabilidade das NPs através da medição do potencial Zeta.
- **Obtenção da morfologia das NPs:** Observar as NPs utilizando técnicas de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).
- **Potencial fotodinâmico:** Determinar a capacidade fotodinâmica das NPs através da medição da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e da produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) usando as respectivas sondas fluores DPBF e DHE e espectroscopia de absorção.
- **Capacidade fotoinativadora:** Avaliar a eficácia das NPs como agentes fotoinativadores das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, investigando seus efeitos fotodinâmicos sob irradiação com luz branca.
- **Potencial fototérmico:** Avaliar o potencial fototérmico das NPs ao determinar as curvas de aquecimento das NPs sob irradiação com laser de 806 nm.
- **Capacidade termoinativante:** Avaliar a eficácia das NPs como agentes em inativações fototérmica das bactérias *S. aureus* e *E. coli*, investigando seus efeitos termodinâmicos por irradiação com laser de 806 nm.
- **Avaliação de alterações morfológicas nas bactérias inativadas:** Investigar os efeitos morfológicos da fotoinativação e termoinativação nas bactérias utilizando MEV.

3. Metodologia

3.1. Preparo das nanopartículas

A síntese das NPs de polímeros conjugados foi realizada utilizando o método de nanoprecipitação, ilustrado na Figura 10. Este método é baseado na preparação de duas soluções separadas: uma orgânica e uma aquosa. A solução orgânica é gotejada lentamente na solução aquosa sob agitação constante, promovendo a formação de NPs (Lima, 2023; Caires *et al.*, 2024).

Duas soluções de estoque são preparadas em tetraidrofurano (THF, IMPEX). Uma contendo 8,9 mg de PCPDTBT (Sigma Aldrich) (concentração final de $890 \mu\text{g mL}^{-1}$) e uma segunda com 4,9 mg de Cn-PPV (Sigma Aldrich) (concentração final de $490 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ambas as soluções de estoque foram armazenadas em freezer a cerca $-12 \text{ }^\circ\text{C}$ por até 30 dias.

Já as soluções-trabalho foram preparadas a partir da diluição das soluções estoques. Cada solução foi diluída em THF a fim de obter as concentrações finais de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ em 2 mL. Dessa forma, foram preparadas três soluções orgânicas de trabalho:

- Solução de PCPDTBT a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- Solução de Cn-PPV a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$;
- Solução combinada de PCPDTBT e Cn-PPV, com concentrações de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para cada polímero, totalizando 2 mL, intitulada Cn-TBT com concentração final de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Cada uma dessas soluções orgânicas foi gotejada separadamente em soluções aquosas, assim três soluções aquosas foram preparadas da seguinte forma: 1,2 mL de uma solução aquosa de Polissorbato 20 (*Tween 20*, Quimesp Química) a 10 mg mL^{-1} , que foi diluído com 8,8 mL de água destilada, resultando em um volume total de 10 mL com concentração final de $1,2 \text{ mg mL}^{-1}$. Estas soluções aquosas foram expostas sob agitação a 700 rpm por 2 min antes de receberem as soluções orgânicas.

Para o gotejamento de cada solução orgânica a 400 mg mL^{-1} , a solução aquosa teve sua agitação regulada para 1600 rpm, e em seguida a solução orgânica foi gotejada para cada gota ter um intervalo de 2 s da anterior, conforme ilustrado na Figura 10. Após a adição das soluções orgânicas, as três misturas foram protegidas da luz e mantidas sob agitação a 700 rpm em uma capela de exaustão por 12 horas para permitir a evaporação do THF.

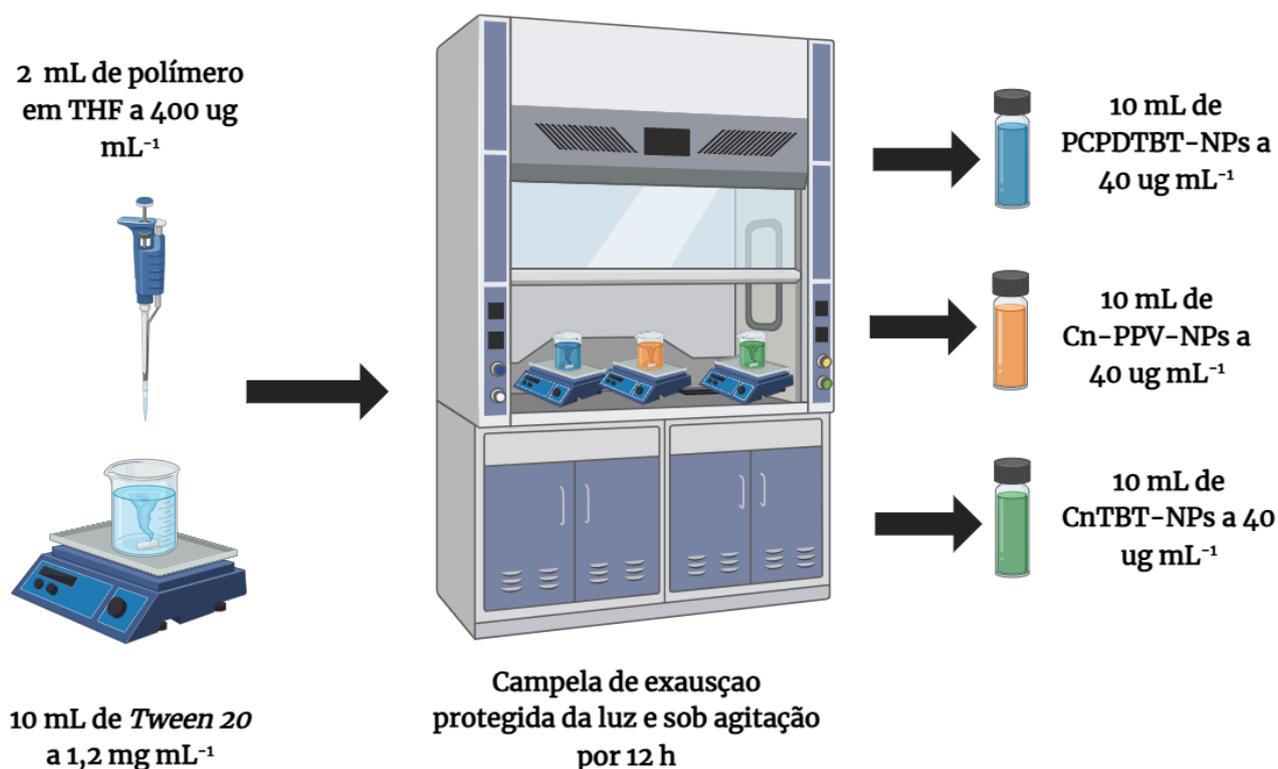


Figura 10: Processo de nanoprecipitação esquematizado.

Após o período de 12 h, devido à evaporação, o volume de água foi ajustado para obter soluções de NPs com concentração final de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ em um volume total de 10 mL, como descrito na Figura 10. Todas as soluções de NPs foram armazenadas protegidas da luz em geladeira a 7°C por até 7 dias. As NPs obtidas foram denominadas conforme segue:

- Cn-PPV-NPs: nanopartículas de Cn-PPV.
- PCPDTBT-NPs: nanopartículas de PCPDTBT.
- Cn-TBT-NPs: nanopartículas de Cn-TBT, resultantes da combinação dos polímeros Cn-PPV e PCPDTBT.

3.2. Caracterizações espectroscópicas: no ultravioleta próximo e visível (UV-Vis), fluorescência e tempo-de-vida

Os polímeros dissolvidos em THF foram analisados frente às suas formas NPs em solução aquosa a fim de verificar mudanças nos perfis espectrais. Assim, os estoques dos polímeros, em THF e armazenados em freezer, foram diluídos para obter uma concentração final de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ em THF. As NPs de cada polímero, confeccionadas no mesmo dia e armazenadas na geladeira, foram diluídas

para atingir a mesma concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ em meio aquoso. Uma amostra de controle foi preparada utilizando *Tween 20* a uma concentração de $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$ (concentração presente nas soluções de NPs a $16 \mu\text{g mL}^{-1}$) para avaliar o efeito do agente surfactante nas medições subsequentes.

As amostras diluídas (NPs, controle e polímeros em THF) foram analisadas utilizando o espectrofotômetro LAMBDA™ 265 UV/Vis. Para cada medição, foram utilizadas cubetas de quartzo com um caminho óptico de 10 mm com quatro faces polidas. O equipamento fez a leitura de 250 a 800 nm.

Após a medição de absorção, a fluorescência das amostras foi avaliada usando o espectrofluorímetro Scinco FluoroMate FS-2. As condições experimentais para a espectroscopia de fluorescência foram de 700 V para a potência da lâmpada, tempo de integração de 5 ms, velocidade de digitalização de 1200 nm min^{-1} , filtro de emissão de 435 nm e fendas de excitação e de emissão com a mesma abertura de 5 nm.

O tempo de vida fluorescente das NPs em meio aquoso foi determinado utilizando a cubeta de quartzo no espectrofluorímetro FluoTime 100. Para a excitação das NPs, foi empregado um laser pulsado do equipamento PicoQuant PDL 800-B, com comprimento de onda de 635 nm. A potência máxima do laser foi utilizada, com a frequência de repetição ajustada para 16 MHz. As medições do tempo durante o qual as NPs permanecem em seu estado excitado antes de retornar ao estado basal foram realizadas no FluoTime 100. Essas medições forneceram dados sobre a dinâmica da emissão fluorescente das NPs, permitindo uma análise detalhada de seu comportamento luminescente.

3.3. Espalhamento dinâmico da luz e Potencial Zeta

As NPs, preparadas no dia anterior, Cn-PPV-NPs, PCPDTBT-NPs e Cn-TBT-NPs, cada uma com concentração inicial de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, foram diluídas para a análise. Para cada tipo de nanopartícula, foram misturados $80 \mu\text{L}$ da solução concentrada com $1920 \mu\text{L}$ de água destilada, resultando em uma solução diluída com uma concentração final de $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Lima, 2023; Caires *et al.*, 2024).

A distribuição de tamanho das NPs foi obtida utilizando o equipamento Malvern Zetasizer, equipado com uma cubeta de eletroforese (DTS1070). O método de aproximação selecionado foi o método de Smoluchowski, adequado para a análise de partículas com base na dimensão das NPs (Liyanage *et al.*, 2016).

O potencial Zeta das NPs foi também analisado no mesmo equipamento e utilizando a mesma cubeta. Para a análise de potencial Zeta, as NPs foram dispersas em solução salina. A solução salina

foi preparada misturando 80 μL da suspensão de NPs com 1920 μL de salina a 10 mM, que foi previamente filtrada para remover impurezas antes da diluição das NPs (Lima, 2023; Caires *et al.*, 2024).

3.4. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das NPs

As amostras de NPs (PCPDTBT-NPs, Cn-PPV-NPs e Cn-TBT-NPs), 48 horas após suas confecções, foram diluídas em meio aquoso até uma concentração final de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, cada uma. Em seguida, 3 μL de cada amostra diluída foram cuidadosamente gotejados de forma independente em placas de sílica, utilizadas como substrato. As placas de sílicas foram então levadas à estufa a 60 $^{\circ}\text{C}$, onde permaneceram secando por 7 dias. Para a análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), as amostras depositadas nas placas de sílica, após a secagem, foram recobertas com uma camada de ouro, por um processo de metalização, para torná-las condutoras e evitar a acumulação de carga durante a varredura do feixe de elétrons. Para a obtenção das imagens, foi empregado o equipamento Jeol modelo JSM-6380LV.

3.5. Geração de espécies reativas de oxigênio

Para se investigar quais os mecanismos de indução da morte celular via processo fotodinâmico, foram utilizados os marcadores Dihidroetídio para Fluorescência (DHE, Group JKlab) e 1,3-diphenylisobenzofuran (DPBF, Group JKlab) para determinar, respectivamente, se as NPs poderiam induzir morte celular via mecanismo Tipo I (produção de EROs) e Tipo II (produção de oxigênio singleto).

Para a determinação da produção de EROs e identificar o fotoproceto do Tipo I, foi utilizado um marcador conhecido e usado para esse fim, o DHE. Segundo Yazdani, 2015, essa sonda não fluorescente reage com superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), peroxinitrito (ONOO^-) e ácido hipocloroso (HOCl), gerando na presença desses EROs o 2-hidroxi-etídio (DH), um composto fluorescente com um pico de emissão em torno de 610 nm, quando excitado em 500 nm. De acordo com Ziolonka, 2010, o DHE não reage com $^1\text{O}_2$. Portanto, é possível acompanhar o aumento da produção de EROs a partir da emissão de fluorescência das espécies geradas.

No experimento de produção de EROs, foram utilizados 0,14 mL de NPs (preparadas a 72 h) na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 40 μL de DHE (a 5,4 mM), todos solubilizados em 1 mL de DMSO. A irradiação foi realizada com um LED vermelho irradiando a cubeta diretamente com uma potência de 8,3 mW cm^{-2} . A geração de EROs (determinada a partir do surgimento do 2-hidroxi-etídio) foi

monitorada pela redução da intensidade de absorção em 359 nm em função do tempo de irradiação. As medidas de absorção foram realizadas com o auxílio do espectrofotômetro LAMBDA™ 265 UV/Vis.

Apesar de convencionalmente a geração de EROs ser monitorada pela fluorescência do 2-hidroxi-etídio, sendo as NPs fluorescentes quando excitadas em torno de 500 nm, não seria conveniente esse monitoramento, pois sendo as NPs altamente fluorescentes quando excitadas entre 460 e 580 nm acabam por suprimir a fluorescência do DHE. Uma vez que a formação do 2-hidroxi-etídio advém da combinação do DHE com as EROs, resulta na diminuição de intensidade de absorção do DHE que possui uma banda de característica em 359 nm. Uma vez que a diminuição da banda em 359 nm deve ser diretamente ligada ao surgimento de EROs, pode-se aplicar uma cinética de primeira ordem para esse tipo de processo dada Equação 1.

$$A(t) = A_0 - R_0 e^{-kt} \quad [1]$$

- $A(t)$ é a absorvância em 359 nm no tempo t ,
- A_0 é a absorvância inicial (no tempo zero),
- R_0 é a quantidade total de variação de absorvância que ocorre devido à reação (neste caso, relacionada à geração de EROs ou oxigênio singletos). Quando a função atinge o seu mínimo (para $t \rightarrow \infty$, quando a reação está completa), a variação total de absorvância desde $t = 0$ será igual a R_0 .
- k é a constante de geração ou degradação (no caso, o coeficiente de geração de EROs),
- t é o tempo de exposição à fonte geradora de EROs.

Essa equação vem da cinética química de primeira ordem, aplicada quando a taxa de reação é diretamente proporcional à concentração de um reagente (no caso, a sonda DHE ou as EROs). Quando se monitora a redução da absorvância, é observada a diminuição da concentração de DHE, indicando a reação com EROs. O coeficiente k é obtido a partir do ajuste da curva experimental aos dados de absorvância em função do tempo.

O DPBF é utilizado para investigar a presença de 1O_2 , pois na presença do 1O_2 o DPBF se decompõe formando 1,2-dibenzoilbenzeno (DPB). Em virtude dessa decomposição, é possível mensurar a diminuição da absorvância do DPBF e relacionar com a produção de 1O_2 , (Carlioni, *et al.*, 1993).

Para o experimento que determinou a geração de 1O_2 , utilizou-se uma solução contendo 140 μL de NPs (PCPDTBT-NPs, Cn-PPV-NPs ou Cn-TBT-NPs) a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 60 μL de DPBF (solução estoque em concentração de 6,1 mM) e 1000 μL de DMSO (obtendo-se uma solução final de 1200

μL colocada numa cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e quatro faces polidas). A irradiação foi realizada com um LED vermelho irradiando diretamente a cubeta com uma potência de $8,3 \text{ mW cm}^{-2}$. A produção de $^1\text{O}_2$ (degradação do DPBF) foi monitorada pela redução da absorbância no comprimento de onda de 415 nm, em função do tempo de irradiação. As medidas de absorção UV-Vis foram realizadas com o auxílio de um espectrofotômetro LAMBDA 265 UV/Vis (Perkin Elmer), o procedimento adaptado de Pivetta, *et al.*, (2017).

Do mesmo modo, que com o DHE, uma vez que a diminuição da banda em 415 nm deve ser diretamente ligada ao surgimento de $^1\text{O}_2$, pode-se aplicar uma cinética de primeira ordem para esse tipo de processo dada pela Equação 1.

3.6. Gradiente de temperatura

Inicialmente, as NPs foram diluídas em PBS (*Phosphate Buffered Saline* - salina tamponada com fosfato, Sigma Aldrich) até a concentração final de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle, foi preparada uma solução de PBS sem a adição de NPs. Cada amostra, incluindo o controle, teve o volume de 200 μL dispersos em poços individuais de uma microplaca de 96 poços. A solução de PBS é usada como solvente e controle. Ao ser aplicado como solvente do caldo de bactérias nos bioensaios, o PBS foi escolhido para o bioensaio por promover controle de osmose e tamponar o pH (Junior, 2020).

As amostras foram então submetidas à irradiação utilizando um laser de diodo modelo BWF2-808-2, operando a um comprimento de onda de 806 nm. O laser foi configurado para operar com uma corrente de 2,74 A, entregando uma potência de $1,4 \text{ W cm}^{-2}$ em cada poço da microplaca. Cada poço contendo uma amostra foi irradiado por um período de 20 minutos.

Durante o processo de irradiação, uma câmera térmica modelo FLIR-C5 foi utilizada para captar imagens térmicas em intervalos de tempo específicos de 0-5 min (em intervalos de 30 s) de 5-10 min (em intervalos de 60 s) e entre 10-20 min (em intervalos de 120 s). Essas imagens térmicas registraram as mudanças de temperatura ao longo do tempo em cada amostra, permitindo uma análise detalhada do aquecimento induzido pela irradiação das NPs.

3.7. Inativação fotodinâmica

Os experimentos foram realizados com as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). As quais são mantidas em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) acrescidas de glicerol a 20% e armazenadas em freezer ($-12 \text{ }^\circ\text{C}$). As suspensões bacterianas foram preparadas a partir do estoque disposto em um microtubo mantido no freezer. Para a inoculação das

cepas, foram adicionados 40 μL do estoque em 2 mL de caldo BHI. Em seguida, a solução foi mantida em um agitador orbital com incubadora (Marconi, MA 420) com agitação de 150 rpm e com controle de temperatura em 37 °C, durante 24 h para o crescimento bacteriano.

Após esse período, os inóculos de *E. coli* e *S. aureus* foram diluídos, separadamente, em solução PBS até a obtenção de turvação de 1,0 da escala de McFarland. Cada inóculo no padrão 1 McFarland teve o volume de 0,5 mL distribuído igualmente em sete eppendorfs. Na sequência, foi adicionado 0,5 mL da solução contendo NPs (preparadas a 72 h), com as concentrações de (i) 0,0 (ii) 16 e (iii) 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Por conta disso, os grupos finais foram (i) 0,0; (ii) 8 Cn-PPV; (iii) 16 Cn-PPV; (iv) 8 PCPDTBT; (v) 16 PCPDTBT; (vi) 8 Cn-TBT; (vii) 16 Cn-TBT. Assim, temos uma solução contendo as NPs em cada uma das concentrações já mencionadas, e as bactérias na concentração de $1,5 \cdot 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$ (i.e., 0,5 na escala de McFarland), cada uma com volume final de 1 mL.

Após as bactérias *S. aureus* e *E. coli* serem expostas às soluções de tratamento, elas foram protegidas da luz e destinadas a um agitador orbital com incubadora com agitação de 120 rpm e com controle de temperatura em 37 °C por um período de 30 min para o processo de internalização das NPs. Na sequência, 200 μL de cada amostra foram retirados e dispostos em duas microplacas de 96 poços separadamente, como dois grupos - (i) irradiado e (ii) controle não irradiado.

Os grupos irradiados foram expostos à luz branca (vermelho, azul e verde, 27 mW cm^{-2}), todas as luzes foram emitidas pelo mesmo painel de LED durante o período de 60 e 90 min, resultando em doses de 250 e 375 J cm^{-2} aplicadas no *S. aureus* e na *E. Coli*, respectivamente.

A seguir, foram realizadas diluições seriadas para ambos os grupos, irradiado e não-irradiado (escuro), a diluição de 1:32 foi selecionada para plaqueamento. Desse modo, foram retirados separadamente 1 μL de cada poço da diluição 1:32, os quais foram semeados e espalhados em placas contendo meio PCA (*Plate Count Agar*, JKLab), em duplicatas. Estas placas foram dispostas em estufa com controle de temperatura de 37 °C durante 24 h.

Por fim, o crescimento bacteriano foi avaliado e as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas. Logo, avaliou-se a sobrevivência ou morte das bactérias frente ao efeito fotodinâmico das NPs. Todas as análises ocorreram em duplicata, e o experimento foi repetido em outras ocasiões. Através do Teste T-Student, por meio do software Origin 2024, foram realizadas as análises estatísticas de variância dos resultados.

3.8. Inativação fototérmica

Os experimentos foram realizados com as mesmas cepas e a inoculação foi realizada de forma idêntica ao empregado na fotoinativação, com a diferença que somente a maior concentração foi empregada e as NPs apresentavam 96 h de armazenamento após seu preparo. Assim, as concentrações finais foram de (i) 0,0 e (ii) $16 \mu\text{g mL}^{-1}$. Resultando em solução contendo as NPs na concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ cada uma, e as bactérias na concentração de $1,5 \cdot 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$.

Após as bactérias *S. aureus* e *E. coli* serem expostas às soluções de tratamento, elas foram protegidas da luz e destinadas à estufa em temperatura de 37°C por um período de 30 min para o processo de internalização das NPs. Na sequência, 200 μL de cada amostra foram retirados e dispostos em uma microplaca de 96 poços.

Os grupos irradiados foram expostos a laser em 806 nm com potência de $1,4 \text{ W cm}^{-2}$ durante 20 min (dose total de 1680 J cm^{-2}). Foi coletado 10 μL nos tempos 0, 5, 15 e 20 min, representando respectivamente as doses de 420, 1.260 e 1680 J cm^{-2} . O volume coletado foi diluído em 1:32 e 1 μL desse diluído foi semeado e espalhado em placas contendo meio PCA. Estas placas foram dispostas em estufa com controle de temperatura de 37°C durante 24 h.

Por fim, o crescimento bacteriano foi avaliado e as UFC foram contadas. Logo, avaliou-se a sobrevivência ou morte das bactérias frente ao efeito térmico das NPs. Todas as análises ocorreram em duplicata, e o experimento foi repetido em outras ocasiões. Através do Teste T-Student, por meio do software Origin 2024, foram realizadas as análises estatísticas de variância dos resultados.

3.9. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das bactérias inativadas

Após os processos de plaqueamento dos grupos irradiados com LED, as soluções contendo *S. aureus* e *E. coli* irradiadas e escuro foram selecionadas nas concentrações de (i) 0,0; (ii) 16 Cn-PPV; (iii) 16 PCPDTBT e (iv) 16 Cn-TBT. Os grupos de *S. aureus* e *E. coli* irradiados com Laser nos tempos 0 e 20 min tratados com (i) Cn-PPV, (ii) PCPDTBT e (iii) Cn-TBT, também foram selecionados.

Todos os grupos selecionados tiveram 100 μL diluídos em 1 mL de GTA (Glutaraldeído, Vetec química fina) a 2,5% em PBS. As amostras foram armazenadas protegidas de luz em geladeira por quatro dias, a fim de o GTA promover a fixação das células. Após os quatro dias, as amostras foram levadas a uma centrífuga refrigerada (KASVI, modelo K14-4415R) a 10.000 rpm por 5 min, com temperatura em 18°C .

Após centrifugado, as amostras tiveram seus sobrenadantes removidos e 1 mL de etanol 10% foi adicionado. Essas amostras foram levadas ao ultrassom por 1 min e novamente foram centrifugadas a 10.000 rpm por 5 min com temperatura em 18 °C. Esse processo de remoção do sobrenadante, adição de álcool, ultrassom e centrifugação foi repedido para álcool e 20, 30, 40, 50, 70 e 100%. As soluções contendo álcool 100% tiveram 10 µL gotejados separadamente em placas de vidros. As placas de vidro foram então deixadas em estufa a 65 °C por 3 dias e, posteriormente, recobertas por ouro e levadas para a obtenção de imagens por MEV no equipamento Jeol modelo JSM-6380LV.

4. Resultados e discussões

4.1. Espalhamento dinâmico da luz e Potencial Zeta

Os diâmetros hidrodinâmicos médios (DHM) de 238, 157 e 163 nm; os Potenciais Zetas com os valores médios de -6, -8 e -6 mV foram obtidos para as PCPDTBT-NPs, Cn-PPV-NPs e Cn-TBT-NPs, respectivamente. A Figura 11 apresenta a distribuição de diâmetros de cada nano partícula.

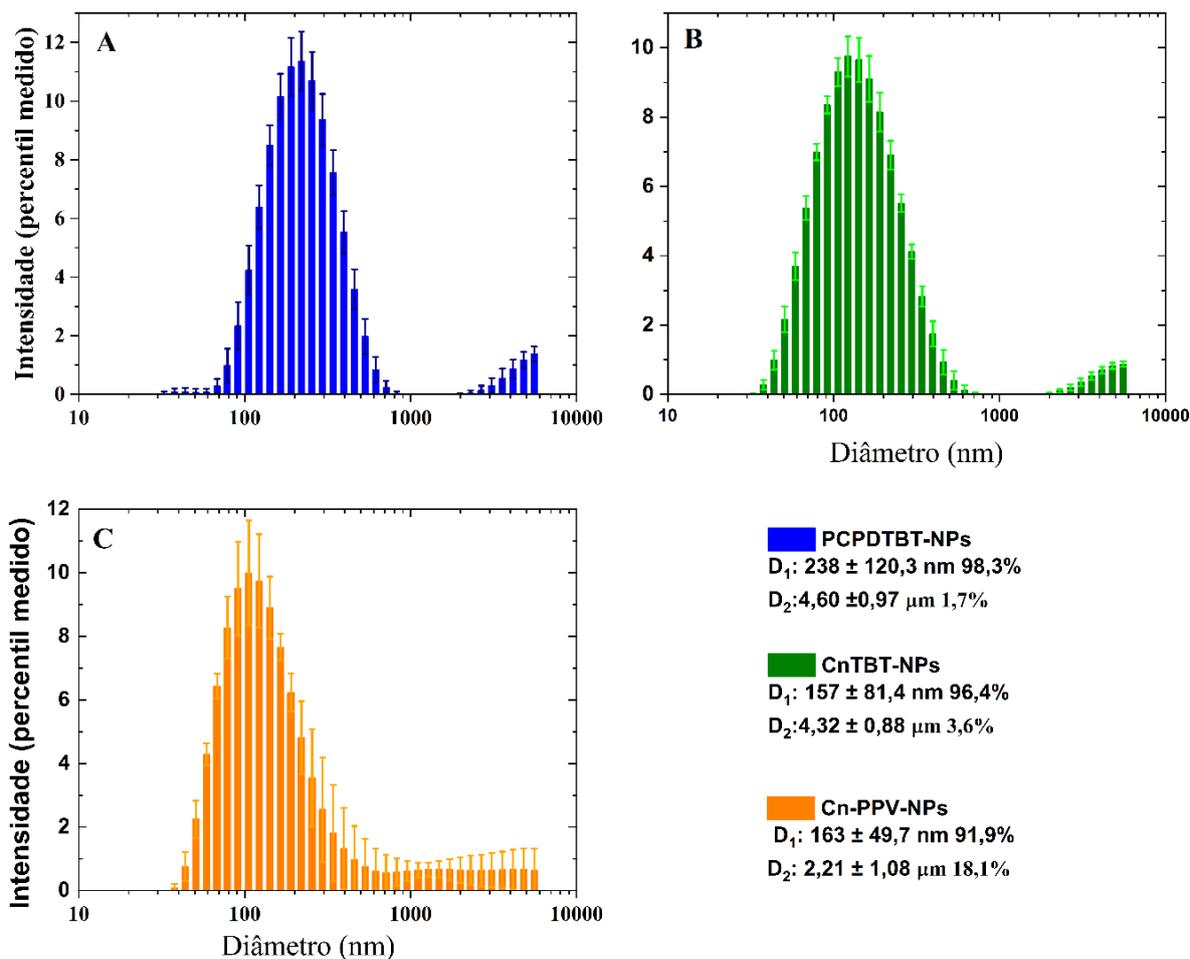


Figura 11: Distribuição de diâmetro hidrodinâmico médio das NPs de (A) PCPDTBT, (B) Cn-PPV e (C) Cn-TBT, com os dois picos de cada distribuição de diâmetros (D_1 e D_2). As medidas foram realizadas com as NPs diluídas em água destilada filtrada e todas as NPs foram empregadas com a concentração de $1,6 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Na Figura 11 temos que PCPDTBT-NPs e Cn-TBT-NPs apresentam respectivamente somente 1,7 e 3,6% de aglomerado com diâmetros na ordem de $4 \mu\text{m}$, já as Cn-PPV-NPs apresentam 18,1% de aglomerados com tamanhos na ordem de $2 \mu\text{m}$. As NPs de menores diâmetros são as Cn-PPV-NPs e Cn-TBT-NPs, assim, podemos verificar que as NPs resultantes da mistura dos polímeros carregam o menor diâmetro médio e o segundo menor percentil de aglomerado. Dessa forma, é possível afirmar que a junção dos polímeros acarreta uma configuração de NPs com diâmetros menores e melhor aproveitamento, isto é, menor porcentagem de aglomerado.

Na Tabela 1 estão dispostos os resultados referentes ao DHM e os valores de Potencial Zeta (ζ) tanto para a formulação principal quanto para as formulações controles, assim como alguns

exemplos contidos na literatura utilizando nanoprecipitação, os mesmos polímeros conjugados e a proporção de fase orgânica para fase aquosa de 1:5.

Tabela 1: Resultados do diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), potencial Zeta e PDI de algumas NPs produzidas por nanoprecipitação com proporção de fase orgânica aquosa de 1:5.

Polímero	Matriz	PDI	DHM (nm)	Potencial Zeta (mV)	pH	Fonte
PCPDTBT	PEG _{5k} -PLGA 55k	0,13	142	-7	6	(Abelha <i>et al.</i> , 2019)
PCPDTBT	PEG _{2k} -PLGA 15k	0,17	131	-12	6	(Abelha <i>et al.</i> , 2019)
Cn-PPV	PLGA-PEG	N.E	110	-55	N.E	(Kemal <i>et al.</i> , 2017)
Cn-PPV	Tween 20	0,1	120	-8	N.E	(Caires <i>et al.</i> , 2023)
PCPDTBT	Tween 20	0,7	209	-6	3,87	Presente trabalho
Cn-PPV	Tween 20	0,31	125	-8	4	Presente trabalho
Cn-TBT	Tween 20	0,31	120	-6	6	Presente trabalho

Legenda: PDI: índice de polidispersividade; DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; N.E: não especificado.

Há alguns fatos que devem ser considerados nas comparações e discussões sobre as discrepâncias entre os valores de Potencial Zeta obtidos e os valores apresentados na literatura. O Potencial Zeta está relacionado com a mobilidade eletroforética (velocidade da partícula quando submetida a um campo eletromagnético) demonstrado na Equação 2.

$$\mu = \frac{U}{E} = \frac{2\varepsilon\zeta F(\xi a)}{3\eta} \quad [2]$$

Logo, de modo intrínseco ao método de obtenção do valor do Potencial Zeta, temos que ele é dependente da permissividade dielétrica do solvente (ε); da viscosidade (η) e principalmente da função de Henry $F(\xi a)$, que pode variar de 1 a 3/2 dependendo do método aproximativo selecionado, ou de Hückel–Onsager ou de Smoluchowski. Abelha *et al.* (2022) especificam o método utilizado como o de Smoluchowski, assim como o presente trabalho.

O método de Smoluchowski é mais vantajoso que o de Hückel–Onsager para sistemas coloidais e suspensões, onde a espessura da dupla camada elétrica é pequena em relação ao tamanho das partículas. O método Smoluchowski é mais simples e eficiente para descrever a mobilidade eletroforética em soluções de baixa concentração de partículas, enquanto o método de Hückel–

Onsager é mais complexo e adequado para soluções diluídas de íons simples. Assim, o método de Smoluchowski é preferido para análises de partículas maiores e sistemas coloidais onde as interações hidrodinâmicas detalhadas são menos relevantes (Klaseboer e Chan, 2020).

Outro importante fator a ser considerado, durante as comparações entre os resultados obtidos para o Potencial Zeta e a literatura, é o de preparo das amostras. Variações de pH, temperatura, concentração salina e até mesmo o sal utilizado interferem no valor e no sinal do Potencial Zeta (ζ) (Hinze, Ripperger e Stintz, 1999; Liu *et al.*, 2018; Nikhil e Arnepalli, 2019). Por conta dessas influências e na ausência da menção destas variáveis, a comparação entre diferentes matrizes ou entre amostras com diferentes preparações é limitada. Um dos principais significados físicos do Potencial Zeta (ζ) é a definição da estabilidade das soluções coloidais de NPs. Desse modo, já é bem estabelecido na literatura que as NPs com valores em intervalo de ± 30 mV são consideradas estáveis (Mayoral *et al.*, 2014).

Dessa forma, a síntese de NPs de PCPDTBT utilizando *Tween 20* como matriz (presente trabalho) apresenta características de potencial Zeta (-6 mV) que não se distanciam significativamente das sínteses de NPs similares reportadas na literatura, como aquelas utilizando matrizes de PEG_{5k}-PLGA 55k e PEG_{2k}-PLGA 15k (-7 mV e -12 mV, respectivamente). O Potencial Zeta das PCPDTBT-NPs com matriz de *Tween 20* em meio ácido indica uma carga superficial ligeiramente negativa, comparável aos Potenciais Zeta observados para as NPs sintetizadas com PEG_{5k}-PLGA 55k e PEG_{2k}-PLGA 15k, respectivamente (Abelha *et al.*, 2019; Imberti *et al.*, 2020).

Essa proximidade nos valores de Potencial Zeta sugere que a síntese com matriz de *Tween 20* pode oferecer vantagens semelhantes em termos de estabilidade coloidal e comportamento de dispersão em meio aquoso. O *Tween 20*, sendo um surfactante não iônico, contribui para a estabilização das NPs através da formação de uma camada de estabilização estérica, que pode prevenir a agregação sem impor uma carga superficial significativa (Zhao *et al.*, 2010).

Assim, o Potencial Zeta de -6 mV das PCPDTBT-NPs e das Cn-TBT-NPs, ambas com matriz de *Tween 20*, representa um equilíbrio favorável entre estabilidade coloidal e biocompatibilidade. Este perfil de carga superficial ligeiramente negativa pode oferecer uma excelente plataforma para aplicações terapêuticas, onde a interação controlada com células-alvo é desejada sem comprometer a estabilidade da nanopartícula no meio fisiológico (Arvizo *et al.*, 2011).

Já o potencial Zeta das NPs de Cn-PPV é idêntico ao relatado por Caires, 2023b, o que era esperado tratando-se da mesma técnica, polímero e com a mesma matriz. A comparação entre as NPs de PCPDTBT e Cn-PPV, ambas sintetizadas utilizando *Tween 20* como matriz, revela diferenças

importantes nos Potenciais Zeta (ζ) e no pH do meio que influenciam diretamente as propriedades de superfície de cada tipo de nanopartícula. As PCPDTBT-NPs apresentaram um Potencial Zeta de -6 mV em meio aquoso com pH de 3,87, enquanto as Cn-PPV-NPs, também sintetizadas com *Tween* 20, exibiram um Potencial Zeta de -8 mV em meio aquoso com pH de 4.

Essas diferenças nos Potenciais Zeta e no pH sugerem que, embora ambas as formulações utilizem a mesma matriz de estabilização esférica fornecida pelo *Tween* 20, a natureza dos polímeros (PCPDTBT *versus* Cn-PPV) e as condições de pH influenciam significativamente a carga superficial resultante das NPs (Mayoral *et al.*, 2014).

A observação do Potencial Zeta das Cn-PPV-NPs sugere que, neste ambiente ligeiramente menos ácido, há uma maior exposição de grupos funcionais carregados negativamente ou uma menor protonação dos mesmos, contribuindo para uma carga superficial mais negativa. O Cn-PPV é um polímero conjugado que pode possuir grupos ciano e outros grupos eletronegativos que mantêm sua carga negativa mesmo em pH ácido, aumentando o Potencial Zeta negativo (Kemal *et al.*, 2017; Fedatto *et al.*, 2021).

Por outro lado, as PCPDTBT-NPs estão em um ambiente mais ácido, o que pode resultar em uma maior protonação de grupos funcionais que poderiam, de outra forma, carregar cargas negativas. No entanto, o Potencial Zeta ainda é negativo, indicando haver uma presença suficiente de grupos que permanecem parcialmente desprotonados ou que a superfície das NPs mantém uma carga negativa, possivelmente devido à estrutura do PCPDTBT (Zhang *et al.*, 2020).

Em resumo, a comparação entre as duas formulações revela que, apesar de ambas utilizarem *Tween* 20 como matriz estabilizadora, a escolha do polímero semicondutor (PCPDTBT *versus* Cn-PPV) e as condições de pH afetam significativamente o Potencial Zeta e, conseqüentemente, a estabilidade coloidal e a interação com paredes celulares e bacterianas.

A síntese de NPs a partir da mescla dos polímeros PCPDTBT e Cn-PPV, resultando na formulação denominada Cn-TBT-NPs, com Potencial Zeta de -6 mV e pH de 6, oferece um perfil distinto em comparação com as NPs formadas a partir dos polímeros individuais. A comparação das Cn-TBT-NPs com as PCPDTBT-NPs e Cn-PPV-NPs revela várias considerações importantes sobre a interação das NPs com o meio aquoso e suas implicações práticas.

As Cn-TBT-NPs, apresentam uma carga superficial negativa semelhante à das PCPDTBT-NPs, que têm um Potencial Zeta de -6 mV, mas com pH 4,86. A similaridade no Potencial Zeta das Cn-TBT-NPs e PCPDTBT-NPs indica que a mescla dos dois polímeros não resulta em uma alteração drástica na carga superficial em comparação com o uso do PCPDTBT isolado.

No entanto, o pH 6 das Cn-TBT-NPs é mais próximo da neutralidade em comparação com as PCPDTBT-NPs. Esse aumento no pH pode reduzir a protonação de grupos funcionais que seriam mais evidentes em pH mais baixo, ajudando a manter a carga superficial negativa em um ambiente mais próximo da neutralidade. Esse pH mais neutro pode também melhorar a compatibilidade das NPs com sistemas biológicos, já que o pH próximo ao fisiológico pode reduzir o risco de reações adversas e melhorar a distribuição e a interação com células e tecidos (Arvizo *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2020).

A semelhança no Potencial Zeta das Cn-TBT-NPs em relação às PCPDTBT-NPs, porém com um pH mais neutro, sugere que a mescla dos polímeros pode se dar com os monômeros da superfície sendo majoritariamente de PCPDTBT e, portanto, não afeta a carga superficial, mas pode oferecer benefícios adicionais em termos de compatibilidade com sistemas biológicos e potencialmente uma melhor aceitação em aplicações terapêuticas (Zhang *et al.*, 2020).

Para os resultados do DHM demonstrado na Tabela 1 nota-se que, apesar de terem matrizes diferentes, os DHM são semelhantes para a PCPDTBT-NPs sintetizadas a partir do método nanoprecipitação. Entretanto, as flutuações entre os resultados podem ser explicadas primeiramente pelo fato de serem polímeros diferentes, mas também pelo fato de terem PDI distintas umas das outras, tendo em vista que o DHM depende da PDI (Zhang *et al.*, 2020; Pinto *et al.*, 2022). É importante ressaltar que após a síntese as NPs não foram filtradas, ou seja, as soluções empregadas na obtenção dos valores dos DHM incluem agregados, o que não apenas aumenta a dispersão de tamanho (alto PDI), mas também aumenta o DHM. É possível verificar a formação de agregados pela formação de um segundo pico na distribuição de tamanhos ilustrado na Figura 11.

As NPs de Cn-PPV em *Tween 20* apresentam um diâmetro hidrodinâmico médio de 125 nm e um PDI de 0,31. Essas partículas são menores e possuem uma distribuição de tamanho mais uniforme em comparação com as NPs de PCPDTBT em *Tween 20*. A menor polidispersividade sugere uma melhor homogeneidade no tamanho das partículas.

No entanto, as Cn-PPV-NPs têm um diâmetro menor do que as PCPDTBT-NPs, o que pode limitar o volume de carga que elas podem transportar ou entregar. Além disso, a diferença no potencial Zeta das NPs, onde as Cn-PPV-NPs podem apresentar uma menor estabilidade coloidal em comparação com as PCPDTBT-NPs, pode impactar a eficácia e a durabilidade das NPs em soluções complexas. Embora as Cn-PPV-NPs se beneficiem de um tamanho menor e uma distribuição mais uniforme, elas podem não oferecer as mesmas vantagens em termos de estabilidade e capacidade de carga proporcionadas pelas PCPDTBT-NPs.

As Cn-TBT-NPs, com um diâmetro hidrodinâmico médio de 120 nm e um PDI de 0,31, combinam o melhor dos dois mundos: tamanho menor e polidispersividade controlada, com uma carga negativa estável e consistente. Este perfil oferece uma distribuição de tamanho bastante homogênea e uma estabilidade coloidal apropriada em comparação com as PCPDTBT-NPs e Cn-PPV-NPs. A superioridade das Cn-TBT-NPs se destaca devido à combinação de um tamanho reduzido e uma polidispersividade baixa, sugerindo uma melhor uniformidade e menor tendência à aglomeração.

Os resultados demonstram que enquanto as PCPDTBT-NPs com *Tween* 20 oferecem vantagens significativas em termos de estabilidade e funcionalidade, sua maior polidispersividade e diâmetro podem limitar sua aplicabilidade em contextos que exigem tamanhos mais uniformes. As Cn-PPV-NPs, embora menores e com uma distribuição de tamanho mais uniforme, podem apresentar limitações em termos de capacidade de carga e estabilidade coloidal. Por outro lado, as Cn-TBT-NPs demonstram superioridade com seu tamanho menor, polidispersividade controlada e estabilidade coloidal, posicionando-as como uma escolha ideal para aplicações que requerem NPs consistentes e eficazes. A combinação dos dois polímeros, PCPDTBT e Cn-PPV, na micela Cn-TBT-NPs, oferece um perfil equilibrado que potencializa os pontos fortes de cada material, resultando em um desempenho superior comparado às NPs individuais. Entretanto, para jugarmos as Cn-TBT-NPs como potenciais FS precisamos compreender o seu perfil óptico.

4.2. Espectroscopia UV-Vis, fluorescência e tempo-de-vida

Na Figura 12 são apresentadas as curvas de absorbância normalizadas das amostras de polímeros em THF (A), das NPs e do *Tween* 20 em meio aquoso (B). Tanto os polímeros quanto as NPs foram empregados na concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto o *Tween* apresentava concentração de $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$.

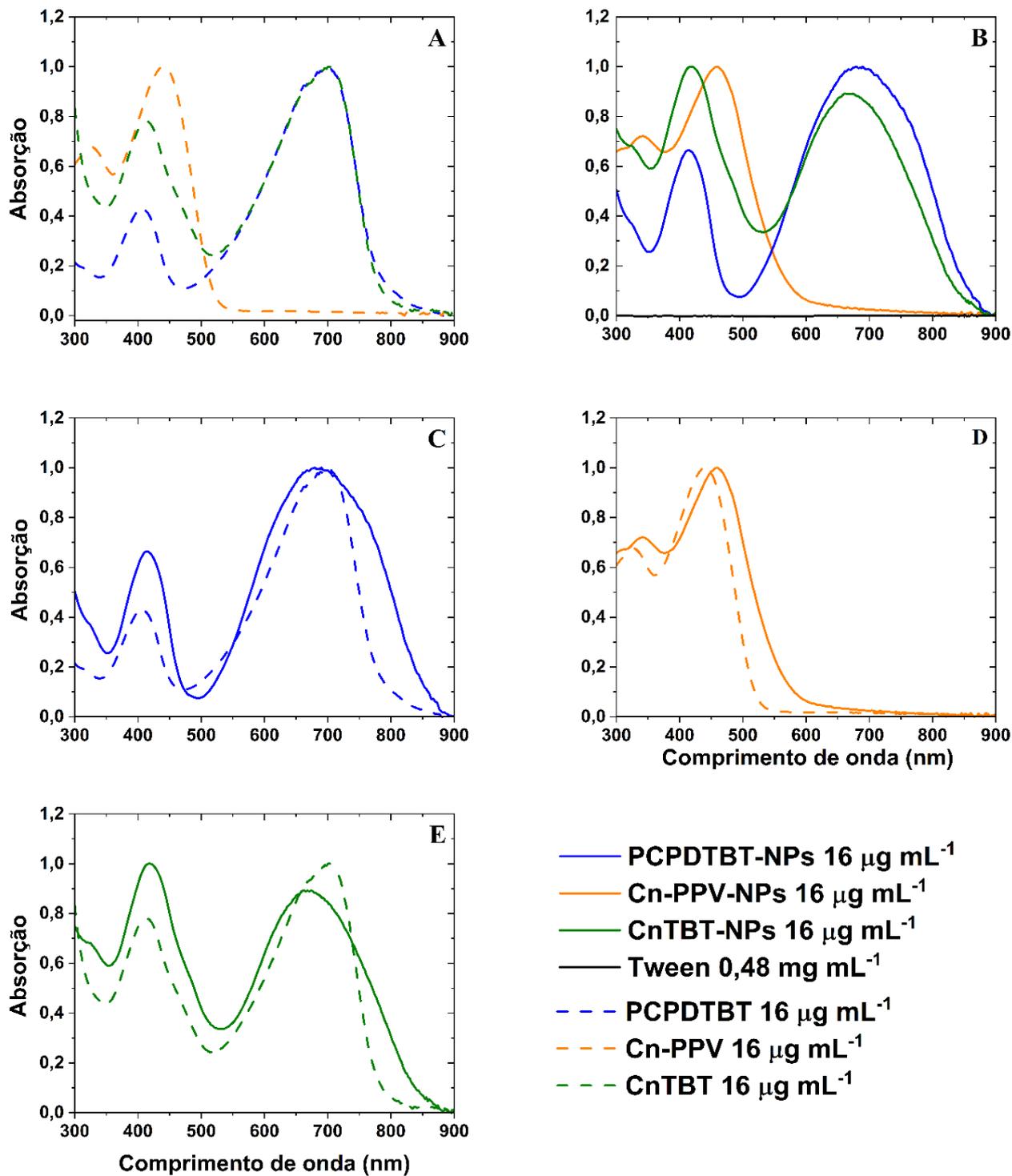


Figura 12: (A) Perfis de absorção dos polímeros (linhas tracejadas) em THF; (B) espectros das nanopartículas (linhas sólidas) e *Tween* 20 em meio aquoso; (C–E) comparação dos perfis dos polímeros em THF com suas formas nanoparticuladas.

Ambos os PCs, ao serem submetidos ao processo de nanoprecipitação, apresentaram seus espectros deslocados para comprimentos de onda maiores (efeito de *red shift*), como pode ser observado na Figura 12B. Esse deslocamento é um indicativo significativo do encapsulamento dos monômeros em estruturas nanométricas (Wang *et al.*, 2016; Martins, 2017; Rabadan, 2020b). Os desvios podem ser verificados com mais facilidade na Figura 12C que faz a comparação direta do polímero PCDTBT com sua forma nanoparticulada, na Figura 12D que faz a comparação direta do polímero Cn-PPV com sua forma nanoparticulada e na Figura 12E que faz a comparação direta da mistura Cn-TBT com sua forma micelar nanoparticulada.

Especificamente, as PCPDTBT-NPs e Cn-TBT-NPs, que na forma de polímeros exibiam absorção até 850 nm em THF, evoluíram para uma absorção que alcança até 900 nm após o processo de nanoprecipitação. Esse aumento no comprimento de onda é frequentemente associado ao efeito de *red shift*, que sugere que a interação entre as cadeias poliméricas foi modificada, possivelmente devido à formação de estruturas mais organizadas ao nível nanométrico, promovendo uma maior delocalização da carga (Wang *et al.*, 2016; Martins, 2017; Rabadan, 2020b). Ou seja, os elétrons não estão restritos a uma única ligação entre dois átomos, mas podem ser compartilhados entre vários átomos.

Da mesma forma, o polímero Cn-PPV em THF (Figura 12A) apresentava absorção zerada acima de 550 nm, mas após o encapsulamento em nanoestruturas, sua capacidade de absorver luz se estendeu até próximos de 700 nm. Essa alteração sugere não apenas o sucesso do nanoencapsulamento, mas também a potencial formação de estados excitados mais estáveis, favoráveis para aplicações em dispositivos optoeletrônicos (Wang *et al.*, 2016; Martins, 2017; Rabadan, 2020b).

A literatura reforça essa observação, destacando que o *red shift* em espectros de absorção é frequentemente associado à formação de NPs e ao aumento da conjugação eletrônica nos polímeros (Wang *et al.*, 2016; Martins, 2017; Rabadan, 2020b). Por exemplo, estudos de Zhou *et al.* (2002) demonstraram que a modificação da estrutura nanométrica de polímeros pode levar a mudanças significativas nas propriedades ópticas, incluindo o deslocamento do espectro de absorção para comprimentos de onda mais longos. Além disso, investigações realizadas por Leventis *et al.* (2018) demonstraram que o encapsulamento de polímeros à base de dicetopirrolpirrol resultou em altos rendimentos quânticos de fluorescência em solução e filmes finos.

Uma discussão sobre as vantagens das novas micelas da solução Cn-TBT (Cn-TBT-NPs), em relação as NPS de seus polímeros constituintes (PCPDTBT e Cn-PPV), destaca aspectos importantes

relacionados à sua capacidade de absorção de luz e potencial de aplicação em processos de fotoinativação. Analisando os espectros de absorção dos polímeros e da micela (Figura 12A), é evidente que o Cn-TBT oferece uma faixa de absorção mais ampla e equilibrada, representando um diferencial significativo em comparação com os polímeros isolados.

De acordo com estudos como o de Soci *et al.* (2007) o PCPDTBT exibe uma banda de absorção característica em torno de 700 nm, enquanto o Cn-PPV mostra uma banda proeminente em aproximadamente 400 nm quando dissolvido em solventes como THF, esses resultados são consistentes com o comportamento observado no presente estudo. Essa concordância sugere que as propriedades ópticas fundamentais dos polímeros constituintes são mantidas quando em solução isolada (Etzold *et al.*, 2012).

Entretanto, alguns estudos mostraram variações nos resultados de absorção dos polímeros isolados, o que pode ser atribuído a fatores como o ambiente solvente e a pureza dos materiais utilizados. Por exemplo, o estudo de Fischer *et al.* (2013) relatou uma variação na intensidade da banda de 700 nm do PCPDTBT quando diferentes tipos de solventes foram utilizados, sugerindo que a interação polímero-solvente pode influenciar significativamente as propriedades ópticas observadas. No caso do Cn-PPV, variações na largura e intensidade da banda de absorção em torno de 400 nm foram observadas devido a diferentes condições de síntese e pureza do polímero. Essas discrepâncias evidenciam a importância de controlar rigorosamente as condições experimentais ao investigar as propriedades ópticas dos polímeros isolados (Etzold *et al.*, 2012; Fischer *et al.*, 2013).

O PCPDTBT mostra adicionalmente uma banda em 404 nm. A solução Cn-TBT, por sua vez, exibe duas bandas em 700 e 415 nm. A presença de uma banda em 700 nm, oriunda do PCPDTBT, mas com intensidade reduzida a 50% do valor original, pode ser explicada pela composição de 50% em massa de cada polímero na micela. Adicionalmente, a banda em 415 nm do Cn-TBT, localizada entre as bandas dos polímeros separados na faixa de 300 a 500 nm, revela uma intensidade intermediária, demonstrando um balanceamento de propriedades entre os dois materiais constituintes.

As Cn-TBT-NPs, em particular, mostram duas bandas distintas em 415 e 670 nm, evidenciando uma absorção de luz mais ampla em comparação com as PCPDTBT-NPs e Cn-PPV-NPs. As PCPDTBT-NPs apresentam bandas em 410 e 685 nm, enquanto as Cn-PPV-NPs possuem uma banda única em 460 nm. O espectro de absorção mais abrangente das Cn-TBT-NPs mostra que conseguem absorver luz em uma faixa mais ampla de comprimentos de onda, mantendo uma intensidade de absorção intermediária entre as NPs dos polímeros isolados.

Essa característica é crucial para aplicações de fotoinativação, onde a eficiência de absorção de luz em várias regiões do espectro visível e próximo do infravermelho pode influenciar diretamente na eficácia do processo. Estudos como os de Kashef *et al.* (2017) mostram que NPs com espectros de absorção mais amplos e equilibrados podendo gerar EROs de forma mais eficaz, aumentando a eficiência da fotoinativação.

Por fim, analisando os espectros de fluorescência das NPs (representados na Figura 13), é possível confirmar a versatilidade e a eficácia das Cn-TBT-NPs para aplicações avançadas em fotoinativação de microrganismos.

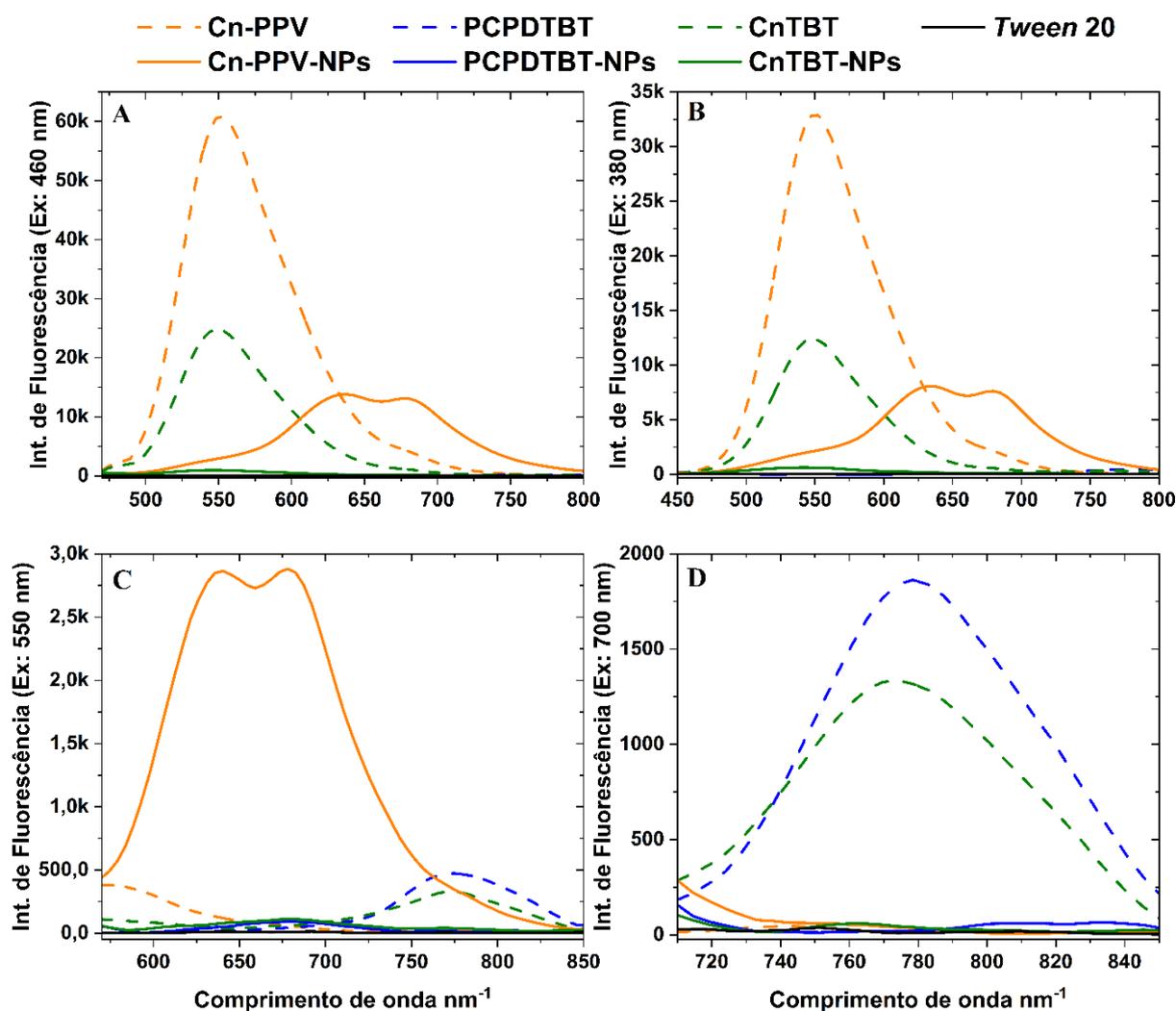


Figura 13: Perfis de fluorescência dos polímeros em THF (linhas tracejadas), das NPs em água (linhas solidas) e do Tween 20 (linha preta). Os compostos foram excitados em 460 nm (A), 380 nm (B), 550 nm (C) e 700 nm (D). Todas as soluções foram empregadas em concentrações de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ com exceção do *Tween 20* que foi empregada a $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$.

A Figura 13 mostra o perfil de fluorescência dos polímeros em THF e de suas NPs em meio aquoso, separadas por comprimento de onda de excitação, sendo a excitação com 460 nm (A), 380 nm (B), (C) 550 nm (C) e 700 nm (D). Em nenhum dos comprimentos de ondas usados o *Tween 20* apresenta fluorescência, logo as diferenças de fluorescências entre os polímeros e suas fórmulas nanoparticuladas se deve exclusivamente ao surgimento de possibilidades de transições intracadeias e intercadeias - transições intercadeia ocorrem quando a transferência de energia se dá entre cadeias poliméricas adjacentes, ao invés de numa única cadeia - resultantes do encapsulamento do polímero em uma nanoestrutura.

Quando o Cn-PPV em solução de THF é excitado a 380 nm ou a 460 nm (próximo ao seu pico de absorção máxima (450 nm) resultando em uma intensidade maior do que com 380 nm), ocorre uma transição eletrônica do estado fundamental (S_0) para um estado excitado de maior energia (S_2 ou superior), seguida de uma rápida relaxação não radiativa - relaxação não radiativa é o processo onde um elétron excitado retorna ao estado de energia mais baixo sem a emissão de luz, convertendo geralmente a energia em calor - para o primeiro estado excitado singlete (S_1) (Soos *et al.*, 1993). A fluorescência observada é resultado da emissão de luz quando os elétrons retornam do estado excitado S_1 para o estado fundamental S_0 (Rauscher *et al.*, 1990). O pico de fluorescência centrado em 550 nm, com uma largura de banda de 500 a 650 nm e intensidade de 32.500, indica uma transição típica π - π^* , onde os elétrons do orbital π (ligante) são excitados para o orbital π^* (antiligante) (Rauscher *et al.*, 1990). A excitação a 550 nm não gera fluorescência no Cn-PPV, como demonstrado na Figura 12, sua absorção a partir desse comprimento de onda é nula.

No caso das Cn-PPV-NPs, excitadas na mesma condição a 380 nm e 460 nm (com intensidade aumentada), observam-se duas bandas de fluorescência sobrepostas com picos em 625 nm e 660 nm, formando um padrão em 'M' com uma largura de banda de 550 a 750 nm. Essa mudança no perfil de emissão, incluindo o deslocamento para comprimentos de onda mais longos (*red shift*), sugere a presença de transições adicionais devido à formação das NPs e ao ambiente diferente (meio aquoso vs. THF) (Rauscher *et al.*, 1990; Soos *et al.*, 1993; Rabadan, 2020b). Nas Cn-PPV-NPs, ocorre um efeito de confinamento quântico - confinamento quântico refere-se quando as dimensões de um material se tornam comparáveis ao comprimento de onda dos elétrons que ele contém, alterando suas propriedades eletrônicas e ópticas - que altera a distribuição de níveis de energia dos orbitais π e π^* , influenciando as transições eletrônicas (Rauscher *et al.*, 1990). Além disso, a interação entre as cadeias poliméricas na matriz de *Tween 20* pode induzir transições intercadeias, onde elétrons

excitados de uma cadeia podem transferir energia para outra cadeia adjacente, resultando em emissão em comprimentos de onda mais longos (Rauscher *et al.*, 1990; Soos *et al.*, 1993; Martins, 2017).

A estabilidade das posições dos picos de emissão indica que os estados excitados nas NPs são menos sensíveis ao comprimento de onda de excitação, possivelmente devido a transições intercadeias mais complexas. A presença de múltiplos estados excitados acessíveis nas Cn-PPV-NPs também sugere a possibilidade de transições intersistema para estados tripleto (T_1), que não são radiativamente ativas, mas podem influenciar os processos de emissão observados (Colaneri *et al.*, 1990; Meng, 1998; Sherwood *et al.*, 2010).

Na Figura 12 foi apresentado que o polímero Cn-PPV não absorvia a partir de 550 nm, enquanto as suas NPs absorvem até próximo a 700 nm, logo, quando as Cn-PPV-NPs foram excitadas com 550 nm (Figura 13C) as Cn-PPV-NPs apresentam duas bandas de fluorescência, agora com picos em 630 nm e 680 nm, uma largura de banda de 600 a 750 nm e intensidade menor. A emissão em 630 nm, que difere dos picos observados anteriormente, sugere a presença de transições eletrônicas adicionais ou o envolvimento de estados excitados localizados que são acessíveis apenas nas NPs (Rauscher *et al.*, 1990; Soos *et al.*, 1993). Além disto, é evidente na Figura 13C que a eficiência quântica de fluorescência das Cn-PPV-NPs é muito superior aos demais polímeros e NPs.

Essa diferença pode ser explicada pela reorganização das cadeias poliméricas no ambiente aquoso das NPs e pelo aumento do relaxamento não radiativo devido à maior liberdade vibracional e rotacional proporcionada pela matriz de *Tween 20* (Colaneri *et al.*, 1990; Meng, 1998; Sherwood *et al.*, 2010). As transições intercadeias também podem ser reforçadas nesse meio, facilitando a transferência de energia entre estados excitados localizados em diferentes cadeias e resultando em um espectro de emissão mais complexo e expandido (Soos *et al.*, 1993; Martins, 2017; Rabadan, 2020b).

A excitação a 700 nm não resulta em fluorescência nem para o Cn-PPV nem para as Cn-PPV-NPs. Isso ocorre porque 700 nm está fora da faixa de absorção dos materiais, como indicado pelos seus perfis de absorção (Figura 12). A falta de fluorescência a 700 nm sugere que a energia fotônica fornecida é insuficiente para excitar os elétrons dos orbitais π para os orbitais π^* ou outros estados excitados (Wang *et al.*, 2016).

As Cn-PPV-NPs apresentam um espectro de emissão mais amplo e deslocado em direção ao infravermelho, o que é vantajoso para aplicações de aIFD, ao permite maior penetração da luz por meio de tecidos biológicos (Abelha *et al.*, 2019; Imberti *et al.*, 2020). A capacidade das NPs de absorver e emitir luz em uma faixa de comprimentos de onda mais ampla também sugere uma maior

eficiência na geração de EROs, essenciais para a fotoinativação de microrganismos (Meng, 1998). A presença de transições intercadeias e a possível formação de estados tripletos aumentam a probabilidade de formação de oxigênio singleto, o qual é altamente reativo e eficaz na inativação de bactérias (Colaneri *et al.*, 1990).

Embora o PCPDTBT em THF mostre uma banda de absorção em 400 nm (Figura 12), ele não apresenta fluorescência quando excitado a 380 nm e 460 nm. Isso pode ser atribuído à ineficiência da transição eletrônica do estado fundamental (S_0) para o primeiro estado excitado singleto (S_1) em comprimentos de onda fora da sua faixa de absorção ideal, resultando em relaxação não radiativa predominante (Colaneri *et al.*, 1990; Meng, 1998).

No entanto, quando excitado a 550 nm e 700 nm, o PCPDTBT em THF apresenta uma banda de emissão centrada em 780 nm, com uma largura de banda de 720 a 840 nm, sendo mais intensa quando excitada a 700 nm. Essa emissão pode ser resultado de transições π - π^* envolvendo orbitais moleculares, onde a excitação em comprimentos de onda mais longos permite a promoção de elétrons dos orbitais π para os orbitais π^* (Colaneri *et al.*, 1990; Rauscher *et al.*, 1990; Meng, 1998; Sherwood *et al.*, 2010).

Por outro lado, a ausência de fluorescência nas PCPDTBT-NPs em todos os comprimentos de onda testados sugere que o encapsulamento quântico tem um papel crucial na modificação dos estados de energia eletrônica do material (Rauscher *et al.*, 1990; Soos *et al.*, 1993). No regime de confinamento quântico ocorre uma alteração na distribuição dos níveis de energia dos orbitais π e π^* (Rauscher *et al.*, 1990). Essa alteração pode restringir as transições radiativas resultando em emissão de luz, favorecendo, em vez disso, processos de relaxamento não radiativo ou transições intersistema para estados tripletos (T_1), que não emitem luz (Meng, 1998; Feng *et al.*, 2013).

Além disso, o ambiente nanoparticulado pode induzir interações intermoleculares adicionais entre cadeias de PCPDTBT, promovendo estados excitados complexos que são menos eficientes na emissão de fluorescência (Feng *et al.*, 2013; Alves *et al.*, 2018). O empacotamento denso e a interação com a matriz de NPs podem, portanto, alterar significativamente as propriedades ópticas, resultando na ausência de fluorescência observada nas PCPDTBT-NPs (Soos *et al.*, 1993; Meng, 1998).

O comportamento da mistura Cn-TBT e de suas NPs (Cn-TBT-NPs) reflete a combinação das propriedades dos polímeros constituintes, Cn-PPV e PCPDTBT, tanto em suas formas livres quanto nanoparticuladas. Quando o Cn-TBT é excitado a 380 nm, ele apresenta um pico de fluorescência a 550 nm, similar ao Cn-PPV, indicando que as unidades Cn-PPV mantêm suas características de emissão em solução. Esse comportamento sugere que, nesse comprimento de onda, as transições

eletrônicas π - π^* do Cn-PPV predominam na micela (Colaneri *et al.*, 1990; Meng, 1998; Sherwood *et al.*, 2010). No entanto, as Cn-TBT-NPs não mostram fluorescência quando irradiadas a 380 nm, comportando-se de maneira semelhante ao PCPDTBT-NPs. Isso sugere que o encapsulamento em NPs altera o ambiente eletrônico da micela, suprimindo possivelmente a fluorescência devido ao aumento das interações intercadeia ou a um efeito de confinamento quântico que impede a emissão radiativa (Colaneri *et al.*, 1990; Rauscher *et al.*, 1990; Soos *et al.*, 1993; Meng, 1998; Sherwood *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Martins, 2017; Rabadan, 2020b).

Quando excitado a 460 nm, o Cn-TBT apresenta novamente um pico de fluorescência a 550 nm, mas com intensidade aumentada em comparação à excitação a 380 nm. Isso reforça a influência do componente Cn-PPV, cuja absorção é mais eficiente nesse comprimento de onda. A intensidade aumentada sugere que a excitação próxima ao pico de absorção máxima do Cn-PPV favorece as transições eletrônicas, resultando em uma emissão mais forte. Novamente, as Cn-TBT-NPs não exibem fluorescência, reforçando a hipótese de que o encapsulamento em NPs suprime as transições radiativas do PCPDTBT (Meng, 1998).

Ao excitar o Cn-TBT a 550 nm e 700 nm, observa-se fluorescência, semelhante ao PCPDTBT, embora com intensidade reduzida em aproximadamente 25% em comparação ao polímero isolado. Isso indica que as transições π - π^* associadas ao PCPDTBT também estão presentes na mistura polimérica, mas de forma menos eficiente, possivelmente devido a uma menor densidade de estados eletrônicos disponíveis ou a uma sobreposição menos efetiva dos orbitais (Colaneri *et al.*, 1990; Meng, 1998). Por outro lado, as Cn-TBT-NPs, assim como as Cn-PPV-NPs isoladas, não mostram fluorescência, sugerindo que a nanoparticulação altera as propriedades ópticas do Cn-TBT e potencializa as interações não radiativas, possivelmente por meio de um empacotamento mais denso das cadeias poliméricas que favorece o relaxamento não radiativo (Meng, 1998).

Em resumo, o comportamento da mistura Cn-TBT e de suas NPs reflete a combinação das características de seus polímeros constituintes, com a forma livre da mistura exibindo fluorescência conforme esperado com base nas propriedades dos componentes Cn-PPV e PCPDTBT. No entanto, a forma nanoparticulada Cn-TBT-NPs parece adotar um comportamento que suprime a fluorescência, semelhante ao observado em ambos os polímeros constituintes quando nanoparticulados. Isso sugere que o confinamento na matriz de NPs exerce um efeito significativo na modulação das transições eletrônicas, favorecendo caminhos de relaxamento não radiativo e minimizando a emissão de luz. Esse comportamento pode ser relevante para aplicações onde a supressão de fluorescência ou a

modulação de propriedades ópticas é desejada, como em sensores e dispositivos de fotoinativação bacteriana.

A supressão de algumas bandas de fluorescência pode ser atribuída a efeitos como interações eletrônicas e transferência de energia entre cadeias, interferência nas transições eletrônicas e efeitos de confinamento quântico e interações intermoleculares. Na micela, a proximidade das cadeias de Cn-PPV e PCPDTBT pode facilitar a transferência de energia não radiativa entre elas, resultando na supressão da fluorescência característica do Cn-PPV. Além disso, a presença de diferentes unidades poliméricas pode alterar os níveis de energia disponíveis para transições eletrônicas, causando interferências que levam à supressão de certas bandas de emissão. Na forma nanoparticulada, o confinamento quântico pode alterar a distribuição dos níveis de energia, favorecendo caminhos de relaxamento não radiativo e aumentando as interações intermoleculares, o que pode resultar em estados excitados menos eficientes na emissão de fluorescência (Colaneri *et al.*, 1990; Rauscher *et al.*, 1990; Soos *et al.*, 1993; Meng, 1998; Sherwood *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016; Martins, 2017; Rabadan, 2020b).

A supressão de bandas de fluorescência também tem implicações para a geração de EROs, como o $^1\text{O}_2$. Em sistemas fotossensibilizadores, a eficiência da geração de $^1\text{O}_2$ é dependente das transições para estados tripleto (T_1), que podem transferir energia para o oxigênio molecular, gerando $^1\text{O}_2$. A supressão de fluorescência e a promoção de estados tripleto podem aumentar a produção de $^1\text{O}_2$, desde que esses estados tripleto sejam efetivamente acoplados ao oxigênio molecular. Além disso, o aumento na dissipação de calor devido à supressão de fluorescência pode ser benéfico para aplicações que envolvem fototermia, como a destruição térmica de células bacterianas ou cancerígenas, mas pode reduzir a eficiência da fotoinativação (geração de EROs). A modulação das propriedades ópticas por nanoparticulação, portanto, pode ser vantajosa para aplicações específicas que dependem da geração de EROs e do controle da fluorescência, por exemplo NPs de conversão ascendente dopadas com lantanídeos podem converter a radiação infravermelha próxima em emissões de energia mais altas, tornando-as promissoras para bioimagem e sensoriamento (Ge *et al.*, 2017).

Para compreender o impacto da fluorescência e sua supressão na geração de EROs, é essencial analisar o tempo de vida dos estados excitados das NPs. A Figura 14 ilustra o tempo de relaxação e o tempo médio de vida das NPs, fornecendo informações cruciais sobre a dinâmica de emissão e a eficiência na geração de EROs.

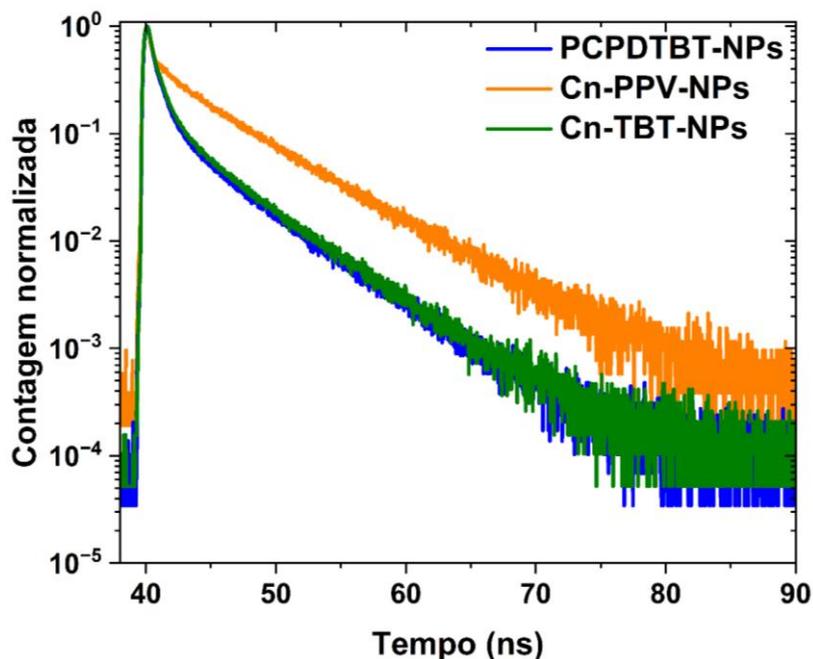


Figura 14: Normalização da contagem de elétrons excitados em função do tempo de excitação das NPs de polímeros. Todas as soluções foram empregadas em concentrações de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ com exceção do *Tween 20* que foi empregada a $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os dados sobre o tempo de vida das Cn-PPV-Ns obtidos com o uso do laser a 635 nm foram possíveis graças ao *red shift* resultante da formação de micelas nanométricas, o que permitiu a absorção nesse comprimento de onda, conforme mostrado na Figura 11D. A quantidade de contagem (intensidade) apresentada na Figura 14 foi alcançada devido ao maior rendimento quântico de fluorescência das Cn-PPV-NPs em comparação com as demais NPs. Essa eficiência superior é evidenciada na Figura 13C.

A diferença nos tempos de vida entre as PCPDTBT-NPs (3,822 ns), Cn-PPV-NPs (5,333 ns) e da micela Cn-TBT-NPs (2,844 ns) pode ser explicada pelos efeitos combinados das propriedades eletrônicas dos polímeros constituintes e das interações dentro da matriz de *Tween 20* (Grey *et al.*, 2006). A matriz de *Tween 20* não apresenta um tempo de vida significativo, indicando que ela não contribui de maneira relevante para a fluorescência ou para a dinâmica dos estados excitados das NPs.

As PCPDTBT-NPs apresentam um tempo de vida relativamente curto de 3,823 ns. Esse valor indica que os estados excitados das PCPDTBT-NPs se relaxam rapidamente, possivelmente devido a processos de relaxamento não radiativo predominantes ou a uma maior eficiência em dissipar energia na forma de calor, em vez de fluorescência (Banerji *et al.*, 2010). Isso pode limitar a geração de $^1\text{O}_2$ pois menos energia é convertida em estados tripleto que poderiam gerar $^1\text{O}_2$.

Já as Cn-PPV-NPs têm um tempo de vida mais longo, de 5,333 ns, sugerindo que as transições radiativas são mais favoráveis, com menos dissipação de energia na forma de calor comparado ao PCPDTBT (Banerji *et al.*, 2010). Isso pode permitir uma maior eficiência na geração de EROs e $^1\text{O}_2$, pois uma maior quantidade de energia dos estados excitados é convertida em estados tripletos dessa forma as NPs permanecem em um estado, metaestável, mais favorável aos processos Tipo I e II.

Enquanto as Cn-TBT-NPs, resultantes da mistura dos dois polímeros constituintes em partes iguais, apresentam um tempo de vida significativamente menor, de 2,884 ns. Esse valor sugere que as Cn-TBT-NPs possuem um tempo de relaxamento mais curto comparado aos seus constituintes individuais, o que pode indicar uma diminuição na eficiência da conversão de energia para estados tripletos. O comportamento observado pode ser resultado de interações eletrônicas e efeitos de transferência de energia entre as unidades Cn-PPV e PCPDTBT, que alteram a dinâmica de relaxamento e podem prejudicar a formação de estados tripletos (Banerji *et al.*, 2010).

Em suma, os resultados apresentados destacam a importância da micela Cn-TBT-NPs em comparação com PCPDTBT-NPs e Cn-PPV-NPs, em termos de propriedades ópticas e potencial de aplicação na fotoinativação de microrganismos. As análises dos espectros de absorção e fluorescência indicam que o micela Cn-TBT, tanto na forma isolada quanto nanoparticulada, demonstra uma faixa de absorção mais ampla e equilibrada, além de uma modulação eficaz das transições eletrônicas, características fundamentais para aplicações que requerem eficiência em uma ampla gama de comprimentos de onda.

A absorção de luz mais ampla das Cn-TBT-NPs, que exibem duas bandas distintas em 415 e 670 nm, contrasta com as bandas mais limitadas das PCPDTBT-NPs e Cn-PPV-NPs. Esta maior abrangência espectral é um fator crucial para a geração eficaz de EROs, necessárias para processos de fotoinativação, como confirmado por estudos prévios (Eroy-Reveles e Mascharak, 2009; Castro *et al.*, 2012). Além disso, as Cn-TBT-NPs mostram uma supressão de fluorescência significativa em comparação com seus polímeros isolados, sugerindo que o encapsulamento em NPs altera as transições eletrônicas, favorecendo caminhos de relaxamento não radiativo (Grey *et al.*, 2006). Este comportamento pode ser desejável em aplicações onde a supressão de fluorescência ou a modulação de propriedades ópticas é necessária, como em dispositivos de fotoinativação bacteriana (Kashef *et al.*, 2017).

As análises de fluorescência reforçam que as mudanças nos perfis de emissão observadas nas NPs, como o *red shift* e a presença de múltiplos estados excitados, podem ser atribuídas a efeitos de confinamento quântico e a interações intercadeias (Rauscher *et al.*, 1990; Banerji *et al.*, 2010). Tais

fenômenos não apenas alteram as propriedades ópticas dos materiais, mas também influenciam diretamente a eficiência das NPs em aplicações fotodinâmicas, potencializando sua capacidade de inativar microrganismos.

Portanto, as Cn-TBT-NPs apresentam vantagens significativas em relação às NPs dos polímeros constituintes isolados, tornando-se uma escolha superior para aplicações que exigem uma absorção eficiente e equilibrada de luz, além de uma elevada geração de EROs (Rauscher *et al.*, 1990; EROsy-Reveles e Mascharak, 2009). Este desempenho otimizado das Cn-TBT-NPs pode ser explorado em uma variedade de aplicações fotodinâmicas, oferecendo novas possibilidades para o desenvolvimento de terapias antimicrobianas avançadas e de sistemas de detecção sensíveis baseados em processos de fotoinativação (Ackroyd *et al.*, 2001). Desta forma, os resultados não apenas contribuem para o entendimento das propriedades ópticas e da dinâmica de fluorescência de NPs poliméricas, mas também abrem caminho para futuras investigações sobre a otimização de materiais para aplicações biomédicas e tecnológicas.

4.3. Microscopia eletrônica de varredura das NPs

As imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) fornecem informações sobre a morfologia das NPs. Podemos verificar na Figura 15 que as NPs possuem morfologias de esferas, já os aglomerados teriam geometrias próximas ao de geoides.

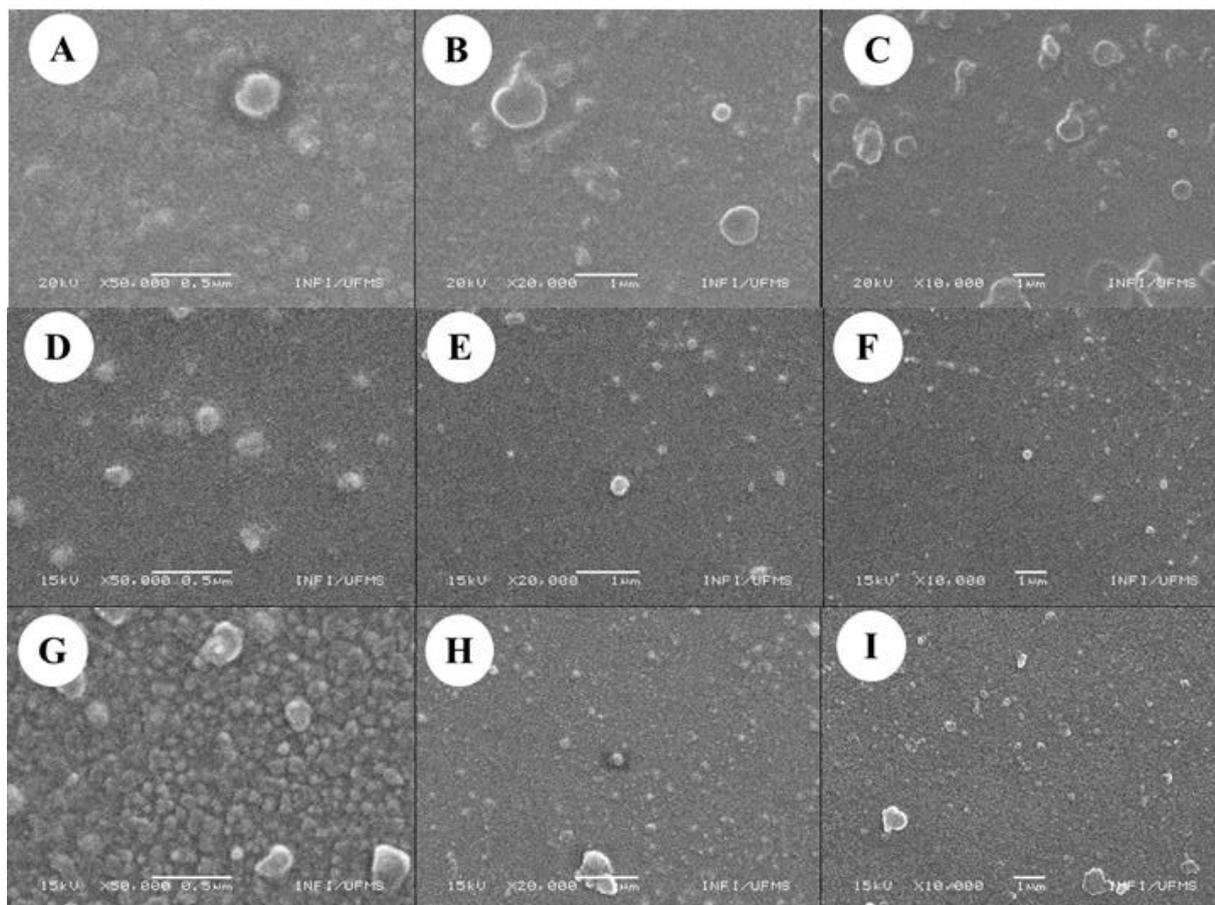


Figura 15: Imagens de microscopia eletrônica de varredura das PCPDTBT-NPs (A-C), Cn-PPV-NPs (D-F) e Cn-TBT-NPs (G-I). Todas as soluções que foram posteriormente secas para obtenção das imagens estavam inicialmente com concentrações de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A Figura 15 colabora com a Figura 11, mostrando em A-C que as PCPDTBT-NPs apresentam maiores diâmetros, mesmo considerando os diâmetros desidratados nas NPs. De D-F verifica corpúsculos melhores definidos e menores, concordando assim que as Cn-PPV-NPs apresentam tamanhos menores que as PCPDTBT-NPs. Já de G-I conseguimos verificar que, assim como as Cn-PPV-NPs temos a presença de corpos melhores definidos e de tamanhos aproximados, o que colabora com os resultados do DLS.

A análise detalhada das imagens permite confirmar a morfologia esférica predominante nas NPs, com a presença de alguns aglomerados de forma irregular que se assemelham a geoides. Essa característica é comumente observada em sistemas de NPs sintetizadas por métodos de auto-organização, como a nanoprecipitação. Nas imagens A-C, as PCPDTBT-NPs apresentam tamanhos significativamente maiores em comparação com as Cn-PPV-NPs (D-F). Isso pode ser atribuído à

menor densidade de interações intermoleculares no polímero PCPDTBT, resultando em uma formação de partículas com maior volume, mesmo após a desidratação (Garcia, 2020).

As Cn-PPV-NPs, mostradas em D-F, exibem partículas bem definidas e uniformes, indicando uma maior estabilidade do sistema coloidal durante o processo de formação. Essa estabilidade é uma característica importante, ao afetar diretamente as propriedades ópticas e a eficiência fotodinâmica, como demonstrado por estudos prévios de Lazzari *et al.* (2012) e Zhao *et al.* (2023).

Por outro lado, as Cn-TBT-NPs, apresentadas em G-I, demonstram uma morfologia semelhante às Cn-PPV-NPs, com tamanhos médios que corroboram os dados de DLS. Isso sugere que a composição híbrida das Cn-TBT-NPs, com proporções iguais de PCPDTBT e Cn-PPV, contribui para a obtenção de propriedades intermediárias. A formação de partículas com tamanhos menores e bem definidos pode ser associada a uma maior eficiência na fotoinativação bacteriana, como relatado por Hamblin (2002) em estudos similares com copolímeros conjugados.

Adicionalmente, a análise qualitativa das imagens indica que as Cn-TBT-NPs possuem menor aglomeração em comparação com as PCPDTBT-NPs, o que pode ser explicado pela melhor compatibilidade química entre os segmentos dos polímeros utilizados (Nguyen *et al.*, 2006; Abelha *et al.*, 2019; Modicano *et al.*, 2020). Isso evidencia a importância do controle das condições de síntese, como a concentração dos polímeros e o tipo de solvente, para otimizar as propriedades morfológicas das NPs, favorecendo suas aplicações em sistemas fotodinâmicos e antimicrobianos.

Por fim, a consistência entre os resultados do DLS e da MEV reforça a robustez do método de caracterização empregado, alinhando-se com outros estudos que destacam a importância de técnicas complementares para a validação dos dados estruturais e morfológicos (Zanetti-Ramos *et al.*, 2010; Klein *et al.*, 2020)

4.4. Geração de EROs, fotoinativação e imagens de MEV das bactérias

A Figura 16 demonstra a curva de degradação do DHE em função do tempo, em especial o quadro B demonstra a região onde a solução de DHE e NPs estiveram sob irradiação e a curva de ajuste da cinética de degradação da banda em 359 nm.

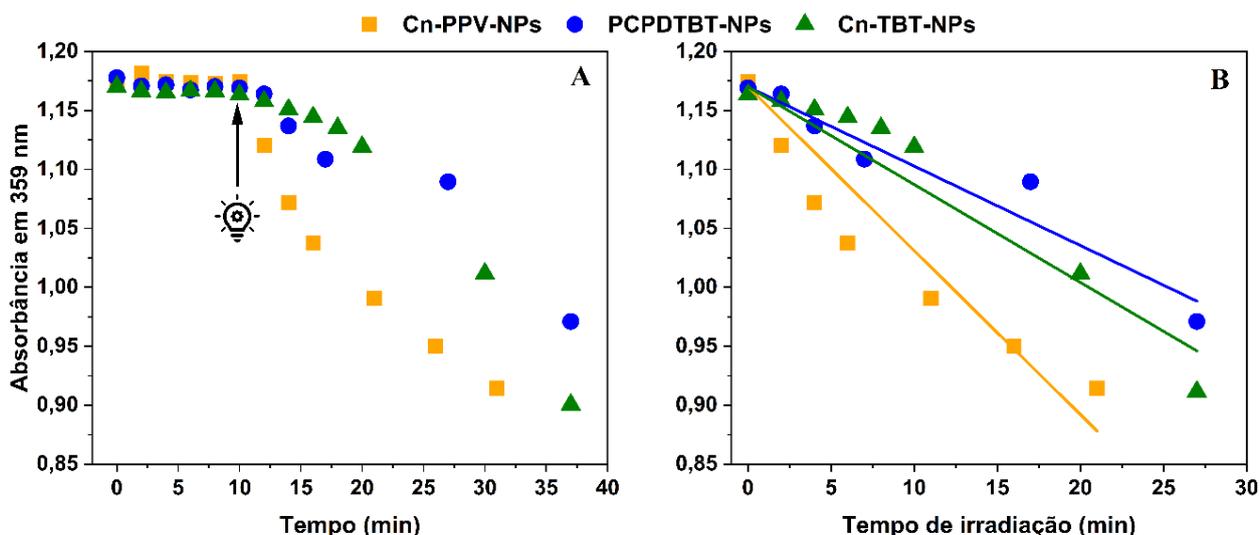


Figura 16: Cinética de degradação do DHE, monitoração da banda de absorbância em 359 nm de 0-37 min (A) e na fase irradiada de 10-37 min – totalizando 27 min sob irradiação - (B). A lâmpada indica onde a irradiação iniciou. O DHE foi empregado na concentração de 100 μM , as NPs a 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o *Tween 20* a 0,48 mg mL^{-1} .

Os pontos presentes na Figura 16A mostram que nos primeiros 10 min, no escuro, não houve queda na absorção em 359 nm, demonstrando então que a presença das NPs e do *Tween 20* por si só não geram a degradação do DHE. A partir de 2 min sob irradiação (12 min no tempo total) todas as NPs apresentaram diminuição na absorção em 359 nm, indicando assim a degradação do DHE, degradação essa que só ocorre na presença de EROs. A Tabela 2 demonstra a constante de geração de EROs (K_{EROS}) de cada NP com base na regressão sob os pontos da Figura 16B.

Tabela 2: Constante de geração de espécies reativas de oxigênio (K_{EROS}) em milimols por min (mM min^{-1}) de cada nanopartícula.

Nanopartícula	K_{EROS} (mM min^{-1})
Cn-PPV-NPs	$0,014 \pm 0,001$
PCPDTBT-NPs	$0,0067 \pm 0,0006$
Cn-TBT-NPs	$0,0083 \pm 0,0006$

A Figura 16 demonstra, claramente, o comportamento das diferentes NPs em relação à degradação do DHE, destacando a necessidade de luz para a geração de EROs. A ausência de alterações na absorbância em 359 nm nos primeiros 10 minutos (fase no escuro) confirma que o DHE não é oxidado na presença das NPs sem a fotoestimulação. Esse comportamento ressalta a

estabilidade do DHE no escuro e evidência que a geração de EROs depende diretamente da irradiação, concordando com resultados prévios na literatura sobre fotossensibilizadores (Hamblin, 2002; Oba, 2007; Rengifo-Herrera *et al.*, 2007; Castro *et al.*, 2012; Etzold *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2017; Caires *et al.*, 2020; Rychtowski *et al.*, 2022; Sheng *et al.*, 2022)

No período de irradiação a variação de absorção com a presença do *Tween 20* pode ser explicada por variação de temperatura, onde a presença dos LEDs ligados podem aquecer a amostra fazendo assim com que o volume da amostra aumentasse (devido agitação térmica) e o sistema demonstrasse a redução indicada, é importante ressaltar que a redução com a presença de *Tween 20* é insignificante comparado a redução com a presença das NPs além de apresentar um comportamento irregular próximo ao de uma reta.

A partir do início da irradiação, as curvas mostram uma queda progressiva na absorbância, indicando a geração de EROs por todas as NPs testadas. Essa degradação, registrada de forma intermediária para as Cn-TBT-NPs (cujo ajuste linear foi $A(t) = 1,17 - 0,0083 \pm 0,00065$ com $R^2 = 0,999$), reflete uma eficiência mediana na geração de EROs, como destacado na Tabela 2, sugere que sua composição híbrida contribui para uma melhor fotoreatividade sob luz vermelha. Esse comportamento pode ser associado ao espectro de absorção mais amplo das Cn-TBT-NPs, que permite uma captura mais eficiente da energia luminosa, característica apontada em estudos de copolímeros conjugados (Li *et al.*, 2011; Saini *et al.*, 2021).

Apesar de as taxas de geração de EROs das PCPDTBT-NPs (cujo ajuste linear foi $A(t) = 1,17 + 0,0067 \pm 0,00056$ com $R^2 = 0,999$) e das Cn-PPV-NPs (cujo ajuste linear foi $A(t) = 1,17 + 0,0139 \pm 0,0011$ com $R^2 = 0,999$), serem ligeiramente diferentes, a diferença entre os três tipos de NPs não é substancial sob as condições de irradiação com luz vermelha. Isso sugere que, em ambientes com espectros de luz mais amplos, como a luz branca, as diferenças no desempenho das NPs podem se acentuar devido à maior capacidade das Cn-TBT-NPs de absorver uma gama mais diversificada de comprimentos de onda (Figura 12). Outro fator relevante que pode levar a uma maior geração de EROs pelas Cn-TBT-NPs é a inibição da fluorescência (Figura 13), que pode favorecer outras vias de relaxamento, como as de cruzamentos intersistema podem levar à geração de EROs, conforme o diagrama de Jablonski simplificado (Figura 7).

Outro aspecto relevante para a eficácia das NPs na geração de EROs é a sua interação com as bactérias-alvo. Embora as Cn-TBT-NPs tenham apresentado eficiência mediana na geração de EROs, fatores como capacidade de adesão às superfícies bacterianas e penetração em biofilmes também influenciam significativamente a eficácia global da fotoinativação (Li *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2023).

Conforme apontado por Gao *et al.* (2023), NPs menores e com superfícies mais reativas tendem a apresentar maior eficácia em interagir com células bacterianas, o que pode ser um diferencial para as Cn-PPV-NPs.

Assim, enquanto as taxas de geração de EROs indicam potencial semelhante entre as NPs sob luz vermelha, a combinação de propriedades espectrais, morfológicas e interações específicas com o alvo bacteriano determinará a eficácia final de cada nanopartícula em aplicações fotodinâmicas. A análise da Figura 17, que demonstra a cinética de degradação do DPBF, será crucial para corroborar esses resultados, particularmente no que diz respeito à produção de $^1\text{O}_2$, uma espécie reativa chave na fototerapia antimicrobiana.

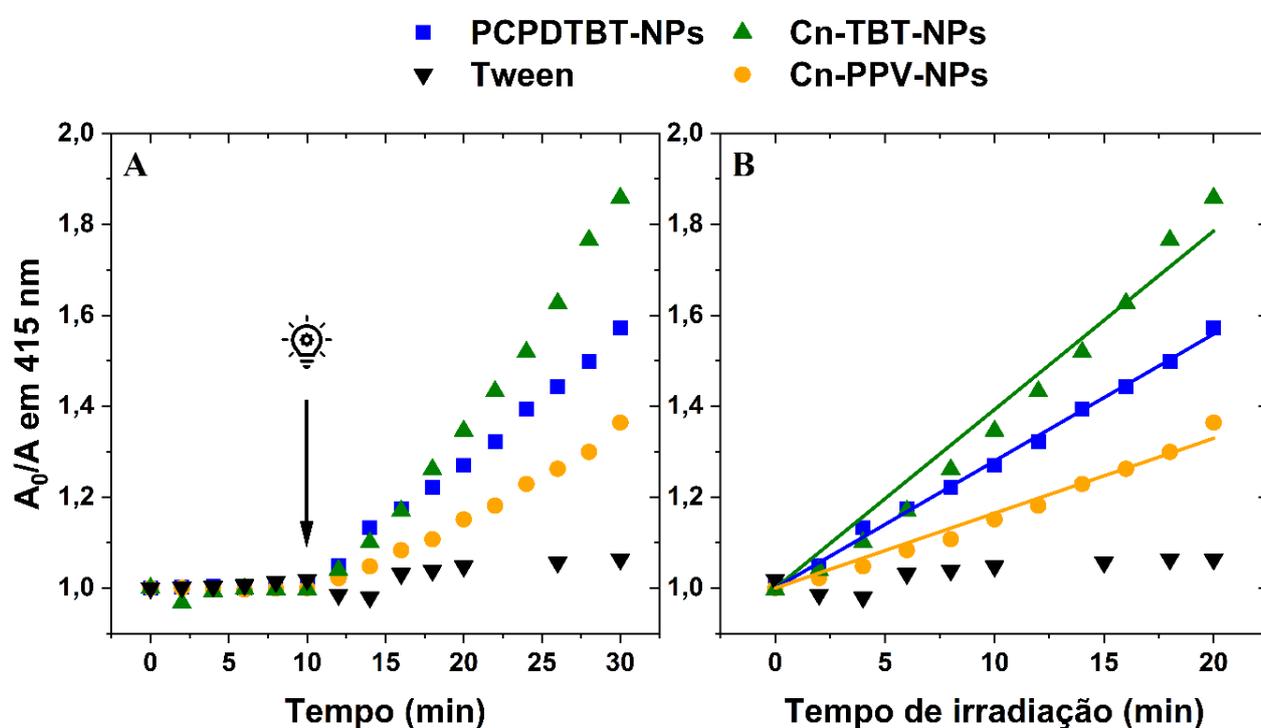


Figura 17: Cinética de degradação do DPBF, em (A) monitoramento da absorção em 415 nm normalizada e (B) período de 10 – 30 min da parte (A) com suas regressões lineares. A lâmpada indica o momento em que a irradiação iniciou. O DPBF foi empregado na concentração de $48 \mu\text{M}$, as NPs a $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o *Tween 20* a $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$.

Os pontos presentes na Figura 17A mostram que nos primeiros 10 min, no escuro, não houve queda na absorção em 415 nm, demonstrando então que a presença das NPs e do *Tween 20* por si só não geram $^1\text{O}_2$. A partir de 2 min sob irradiação (12 min no tempo total), todas as NPs (representada pelas retas crescentes na Figura 17B) e o *Tween 20* apresentaram diminuição na absorção, indicando

assim que a degradação só ocorre sob irradiação. A Tabela 3 mostra a constante de geração de $^1\text{O}_2$ ($K_{1\text{O}_2}$) de cada NP com base na regressão sob os pontos da Figura 17B.

Tabela 3: Constante de geração de oxigênio singleto ($K_{1\text{O}_2}$) em milimols por minuto (mM min^{-1}) de cada nanopartícula.

Nanopartícula	$K_{1\text{O}_2}$ (mM min^{-1})
Cn-PPV-NPs	$0,0165 \pm 0,0004$
PCPDTBT-NPs	$0,0279 \pm 0,0002$
Cn-TBT-NPs	$0,0393 \pm 0,0001$

O processo de geração de $^1\text{O}_2$ ocorre devido à excitação fotoinduzida das NPs (NPs), que, pelo mecanismo tipo II, transferem energia para o oxigênio molecular do meio em seu estado tripleto ($^3\text{O}_2$). Esse oxigênio, ao receber energia, é convertido para o estado singleto excitado, capaz de degradar o DPBF (Farhat *et al.*, 2023). Esse processo depende diretamente da capacidade das NPs de absorverem a radiação incidente. No experimento, a radiação utilizada foi emitida por LEDs que produzem luz vermelha. Como as NPs dos polímeros Cn-PPV NPs (cujo ajuste linear foi $A(t) = 1 + 0,0165 \pm 0,0004$ com $R^2 = 0,999$), PCPDTBT NPs (cujo ajuste linear foi $A(t) = 1 + 0,0279 \pm 0,0002$ com $R^2 = 0,999$) e da mistura (Cn-TBT-NPs NPs - cujo ajuste linear foi $A(t) = 1 + 0,0396 \pm 0,0001$ com $R^2 = 0,999$) apresentam absorção para comprimentos de ondas menores (azul e verde) (Figura 12), é possível inferir que suas eficiências na geração de $^1\text{O}_2$ seria maior sob irradiação de luz branca, como a proveniente de um sistema de LEDs RGB (Sheng *et al.*, 2022). Note que, com a presença de *Tween 20* existe uma variação na absorção, porem uma variação insignificante frente com a presença de NPs, essa diferença pode ser devido ao aquecimento da solução (resultante dos LEDs) levando ao aumento do volume e conseqüentemente a redução de concentração, toda via, esse fenômeno, como mostrado na Figura 17B é irrelevante.

A Tabela 4 revela que as Cn-TBT-NPs apresentaram o maior rendimento na geração de $^1\text{O}_2$, superando as PCPDTBT-NPs, que apresentaram o menor rendimento, mesmo que estas últimas tenham maior absorção no pico centrado em 700 nm. Isso sugere que o confinamento de dois monômeros distintos na estrutura das Cn-TBT-NPs possibilita transições eletrônicas indisponíveis em estruturas contendo apenas monômeros de PCPDTBT. Essas novas transições suprimiram vias radiativas (demostrado pela supressão de fluorescência na Figura 17) e, conseqüentemente, favorecer cruzamentos intersistema mediados por interações intercadeias poliméricas, resultando na

transferência eficiente de energia para o $^3\text{O}_2$ via mecanismo Tipo II (Eroy-Reveles e Mascharak, 2009; Castro *et al.*, 2012; Sheng *et al.*, 2022).

De modo geral, as Cn-TBT-NPs são mais promissoras para a inativação bacteriana quando comparadas às demais NPs estudadas. Elas apresentam rendimento de EROs equivalente às outras NPs, mas com maior eficiência na geração de $^1\text{O}_2$. Essa característica as torna mais eficazes em causar danos celulares e reduzir a contagem de UFC em experimentos bactericidas. A Figura 18 demonstra os resultados do plaqueamento dos grupos de tratamento no escuro e irradiado, sendo que o *S. aureus* foi irradiado por 60 min e as *E. coli* foram irradiadas por 90 min.

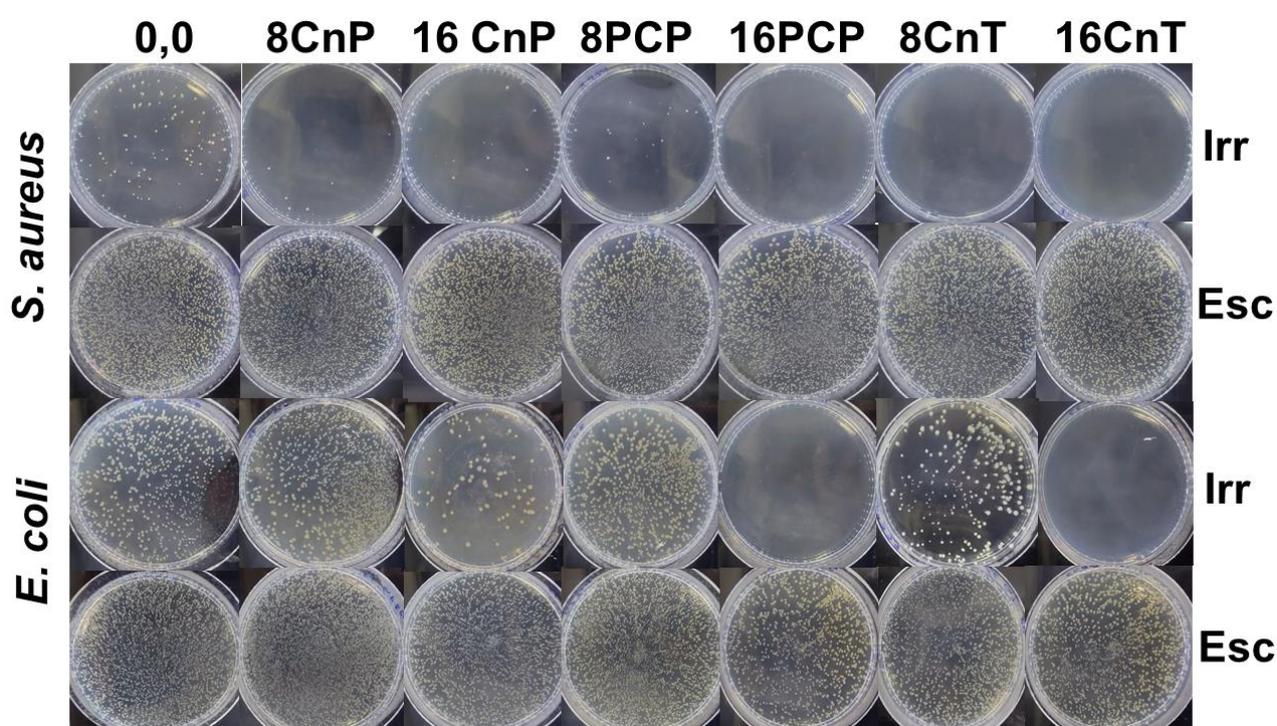


Figura 18: Plaqueamento das bactérias *E. coli* e *S. aureus* de seus grupos escuros (Esc) e irradiados (Irr) de todas as concentrações estudadas.

Como apresentado na Figura 18, os grupos irradiados e tratados com $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cn-TBT-NPs apresentaram redução superior a 3 logs. A partir da Figura 18, foi possível construir a Figura 19 com a contagem de UFC por mililitro (UFC mL^{-1}).

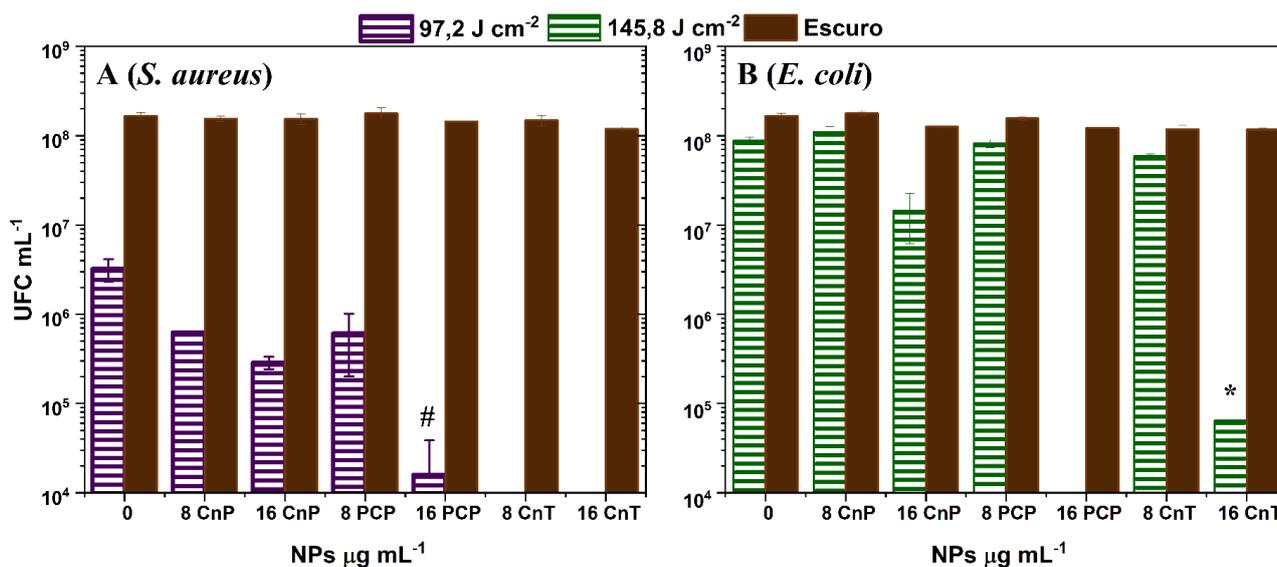


Figura 19: Contagem de unidades formadoras de colônias (UFC mL⁻¹) das bactérias *S. aureus* (A) e *E. coli* (B). # redução >99,99% e * redução de 99,94%.

A Figura 19 mostra que nenhuma NP apresentou citotoxicidade contra as bactérias testadas, isto é verificável, pois todos os grupos escuros de ambas as bactérias não apresentam redução de UFC. A bactéria *S. aureus* apresenta redução de crescimento de cerca de 1,5Log do grupo negativo irradiado, por apresenta grupos cromóforos sensíveis ao componente azul do sistema RGB. Os grupos de *S. aureus* com Cn-PPV-NPs (8 CnP e 16 CnP) apresentam redução significativa em relação aos controles, sendo que o grupo com concentração de 16 μg mL⁻¹ apresenta redução de 0,5Log em relação ao controle irradiado. Nos grupos com PCPDTBT-NPs notamos que o grupo com concentração de 16 μg mL⁻¹ apresenta redução de 99,99%. Os grupos de *S. aureus* com Cn-TBT-NPs à 8 μg mL⁻¹ (8 CnT) apresentam redução > 99,99%, sendo esse grupo com 4 μg mL⁻¹ de cada polímero. É notável o efeito sinérgico da nova micela.

O maior efeito das Cn-TBT-NPs pode ser devido à maior penetração das NPs devido ao seu menor diâmetro, aumento de interação eletroestática das NPs com a parede bacteriana, bem como aumento na geração de oxigênio singlete. As imagens MEV (Figura 20) revelam as morfologias das bactérias antes e após o ensaio de fotoinativação, evidenciam os danos causados às bactérias.

Nas bactérias *E. coli* tratadas apenas com luz, com Cn-PPV-NPs (ambas as concentrações), com 8 μg mL⁻¹ de Cn-TBT-NPs e PCPDTBT-NPs (8 PCP) apresentaram redução de <1log, sendo que os grupos tratados com 16 μg mL⁻¹ de PCPDTBT-NPs (16 PCP) e de Cn-TBT-NPs (16 CnT) apresentam redução >99,99% e de 99,61% respectivamente. Dessa forma, um tratamento com uma

dose superior deverá levar à inativação superior a 99,99% de *E. coli* utilizando a concentração de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Cn-TBT-NPs.

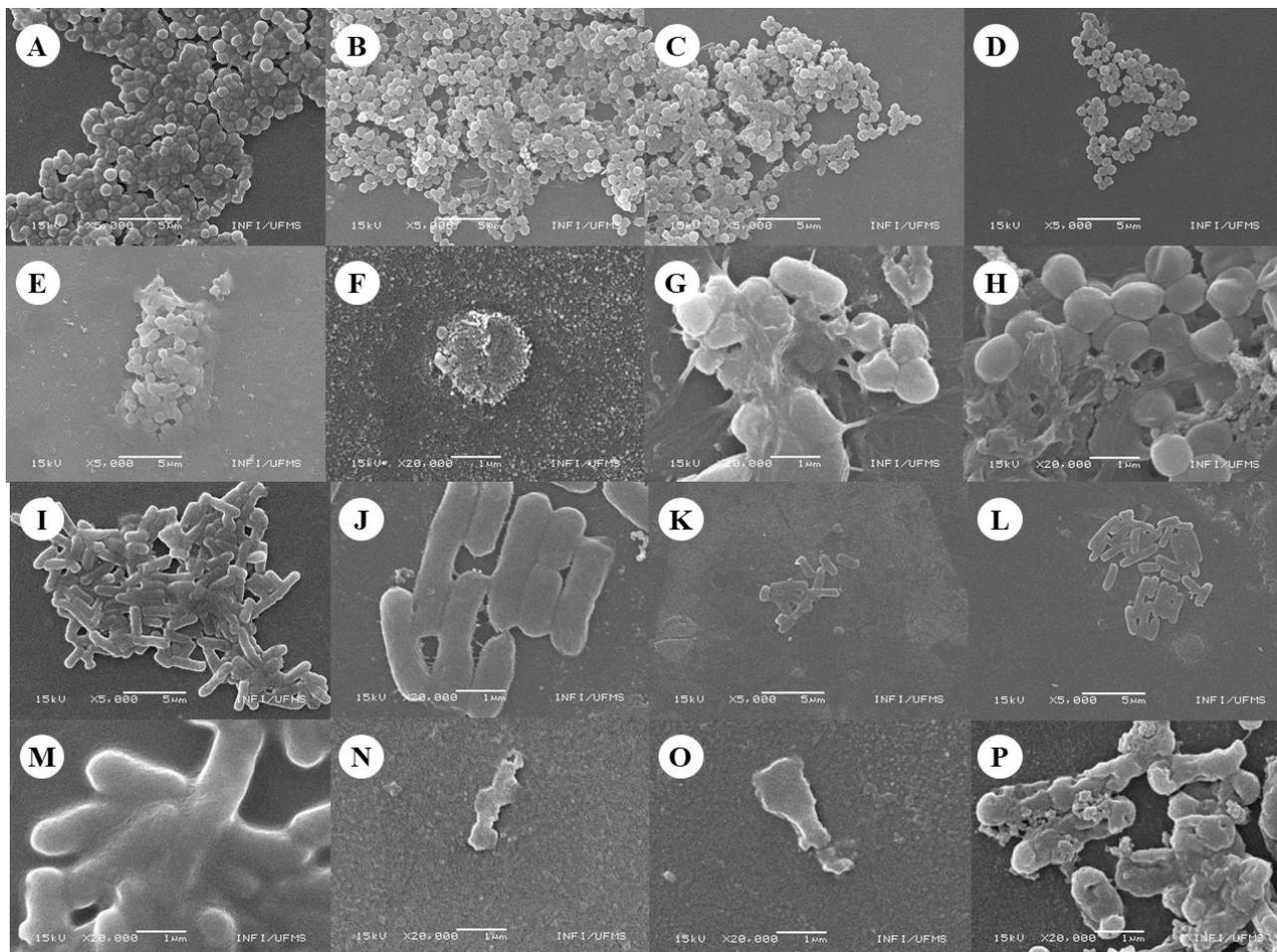


Figura 20: Imagens de microscopia eletrônica de varredura da morfologia antes e após bioensaios de inativação fotodinâmica. *S. aureus* antes da irradiação (escuro): (A) grupo controle negativo, (B) PCPDTBT-NPs, (C) Cn-PPV-NPs e (D) Cn-TBT-NPs, todos sem alterações morfológicas. *S. aureus* após a irradiação: (E) controle irradiado apresentando leves danos por cromóforos endógenos, (F) PCPDTBT-NPs exibindo parede rugosa, (G) Cn-PPV-NPs com rugosidade e vazamento de fluido, e (H) Cn-TBT-NPs com rugosidade intensa e vazamento de fluido. *E. coli* antes da irradiação (escuro): (I) grupo controle negativo, (J) PCPDTBT-NPs, (K) Cn-PPV-NPs e (L) Cn-TBT-NPs, todos sem danos. *E. coli* após a irradiação: (M) controle irradiado apresentando danos leves, (N) PCPDTBT-NPs com formação de bolhas na parede bacteriana, (O) Cn-PPV-NPs com parede rompida e vazamento de fluido, e (P) Cn-TBT-NPs com rugosidade e ruptura da parede. Em todos os grupos tratados (B-D, F-H, J-L e N-P) é possível observar corpúsculos esféricos, atribuídos às NPs. A concentração utilizada de NPs nos ensaios das imagens foi de 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$, já os inoculos de baterias estavam inicialmente em 0,5 da escala McFarland.

As imagens de MEV destacam alterações morfológicas características em *S. aureus* e *E. coli*, antes e após a irradiação, com diferentes grupos de tratamento. Nos painéis (A–D) e (I–L), correspondentes aos grupos controle negativo escuro e aos tratamentos escuros (PCPDTBT-NPs, Cn-PPV-NPs e Cn-TBT-NPs), as bactérias mantêm sua morfologia típica (Bachir e Abouni, 2015; Oliveira *et al.*, 2019). Essa preservação estrutural confirma a ausência de citotoxicidade significativa em condições sem irradiação, em concordância com estudos que demonstram a segurança das NPs fotossensibilizadoras quando não ativadas (Méndez-Pfeiffer *et al.*, 2019).

Após a irradiação, nos painéis (E–H) para *S. aureus*, as alterações são marcantes. O controle irradiado (E) exibe danos leves, provavelmente causados pela geração limitada de EROs a partir de cromóforos endógenos. No entanto, os grupos tratados com PCPDTBT-NPs (F), Cn-PPV-NPs (G) e Cn-TBT-NPs (H) mostram danos mais intensos. A rugosidade observada em (F) sugere desorganização da membrana celular, enquanto os painéis (G) e (H) apresentam sinais de ruptura da membrana e vazamento de fluidos intracelulares. Essas alterações indicam uma interação eficiente das EROs geradas pelas NPs com os componentes lipídicos e proteicos da membrana bacteriana (Cui *et al.*, 2012; Slavin *et al.*, 2017; Metryka *et al.*, 2023).

No caso de *E. coli*, observada nos painéis (M–P), as alterações morfológicas após irradiação também são notáveis. O controle irradiado (M) não apresenta danos, consistentes com o efeito limitado dos cromóforos endógenos nessas bactérias (Messner e Imlay, 1999). Em contraste, o painel (N), correspondente às PCPDTBT-NPs irradiadas, mostra formação de bolhas na superfície bacteriana, atribuída à interação das EROs com a membrana, causando desestabilização local (Garcez *et al.*, 2020). Os tratamentos com Cn-PPV-NPs (O) e Cn-TBT-NPs (P) revelam rupturas severas da parede bacteriana e perda de conteúdo intracelular, sugerindo uma eficiência superior na inativação fotodinâmica.

A presença de corpúsculos esféricos próximos às bactérias, especialmente visíveis nos grupos tratados, indica que as NPs aderem à superfície celular antes da irradiação, facilitando a geração localizada de EROs e potencializando os danos (Agel *et al.*, 2019). Essa interação destaca a importância da modulação de propriedades como tamanho, carga superficial e funcionalização das NPs para otimizar sua eficiência fotodinâmica (Bekmukhametova *et al.*, 2020).

Os resultados ilustram que a aIFD mediada por NPs conjugadas é eficaz na desestabilização da integridade estrutural bacteriana, com diferenças nos danos causados em *S. aureus* e *E. coli*. Esses achados reforçam o potencial dessas NPs como agentes antimicrobianos avançados, capazes de superar as limitações de terapias convencionais, especialmente frente à crescente resistência

antimicrobiana. Como as PCPDTBT-NPs apresentam aplicações fototérmicas, uma segunda via de inativação pode ainda ser alcançada usando fonte luz no infravermelho.

4.5. Gradiente de temperatura, terminativação e imagens de MEV das bactérias

Como apresentado anteriormente, a geração de EROs e de $^1\text{O}_2$ são cruciais em cenários que visam a inativação fotodinâmica, porem ao explorarmos uma via de efeitos térmicos, como a inativação fototérmica, o que dita a eficácia das NPs é a sua capacidade de gerar calor quando irradiadas por uma fonte de luz fora do espectro visível, mais precisamente no infravermelho. Assim, a Figura 21 apresenta o gradiente de temperatura que as NPs irradiadas com laser em 806 nm com concentrações de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ e das PCPDTBT-NPs com concentração de $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (concentração teórica presente no Cn-TBT) alcançaram ao longo de 20 min.

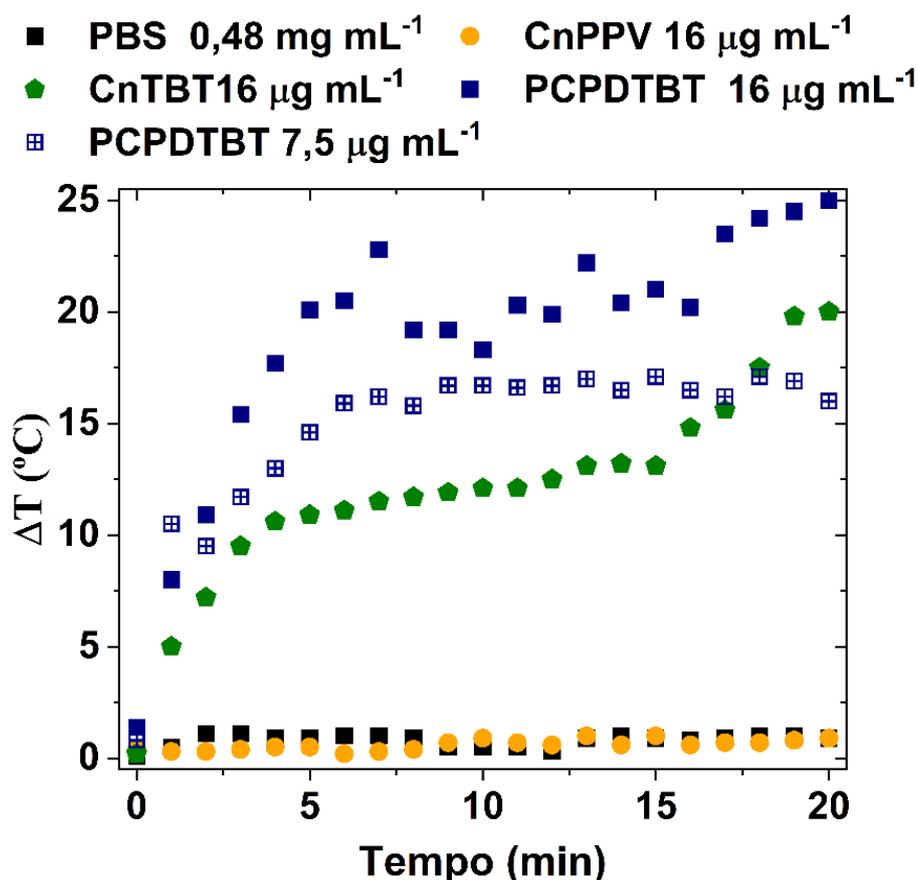


Figura 21: Gradiente de temperaturas do PBS, da NPs de PCPDTBT, Cn-PPV e Cn-TBT, irradiadas com laser. Com exceção da concentração de $7,5 \mu\text{g}$.

A Figura 21 demonstra que as Cn-PPV-NPs e o PBS não aquecem sob irradiação do laser em 806 nm, o que já era esperado devido à transparência do PBS e da absorção das Cn-PPV-NPs findar em 550 nm (conforme Figura 12). Já as PCPDTBT-NPs ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresenta um gradiente de até 25°C , esse gradiente refletiu em uma temperatura final de 58°C , é notável que a partir de 5 min essas NPS já atingem um gradiente de 20°C que advém de uma temperatura de cerca de 53°C , temperatura já suficiente para causar danos nas bactéria.

As PCPDTBT-NPs à $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentam uma variação de apenas 15°C , o que não é suficiente para inibir o crescimento bactérias em um tempo curto. As Cn-TBT, que devem apresentar cerca de $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ de PCPDTBT demonstraram um gradiente de 20°C ao final dos 20 min de irradiação, isso significa que o nano encapsulamento de Cn-PPV e PCPDTBT cada um com $7,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ gera relaxações vibracionais internas, que com um maior tempo atingem temperatura suficiente para inibir o crescimento bacteriano (Espinosa *et al.*, 2020).

Dessa forma, foi realizado o ensaio biológico com os grupos contendo PBS (para verificar se o laser não poderia matar as bactérias por si só), Cn-PPV-NPs, PCPDTBT-NP e Cn-TBT-NPs a $16 \mu\text{g mL}^{-1}$. A Figura 22 mostra o plaqueamento dos grupos tratados antes e após 20 min sob irradiação do laser.

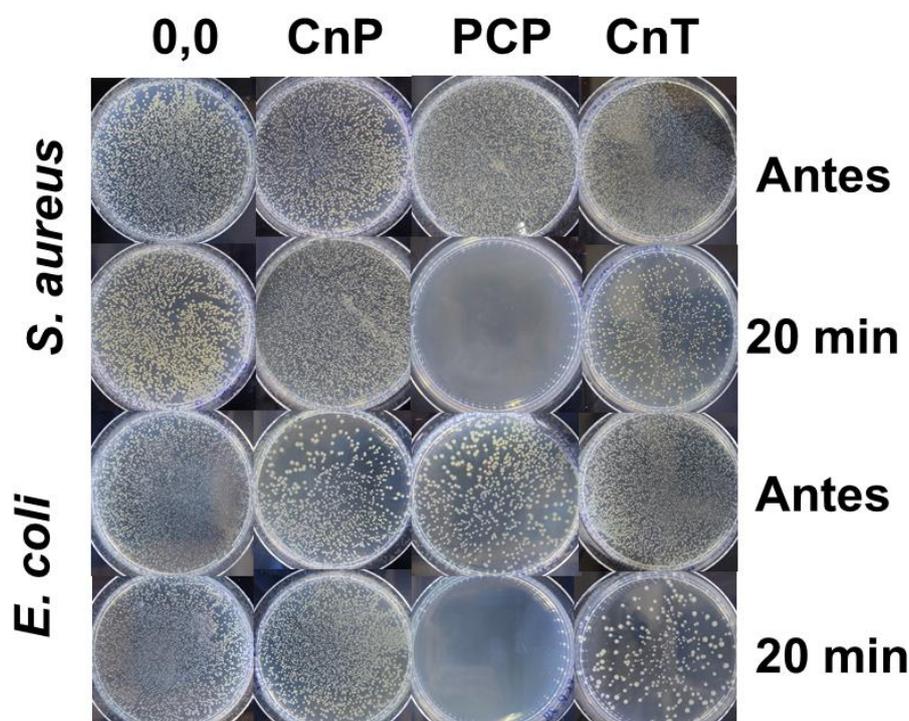


Figura 22: Plaqueamento dos grupos estudados de ambas as bactérias antes e com 20 min de irradiação sob laser após 24h de incubação e com diluição de 1:32 antes de serem semeadas.

Na figura 22, já é evidente que as PCPDTBT-NPs foram letais para ambos os microrganismos, e que as Cn-TBT-NPs foram mais eficientes contra *E. coli*, causando assim uma maior redução com 20 min de irradiação. Com as placas ilustradas na Figura 22, foi possível construir a Figura 23, que mostra a contagem de UFC mL⁻¹ de todos os grupos nos tempos de 0, 5, 15 e 20 min, recebendo doses de 125, 1.260, e 1.680 j cm⁻² respectivamente.

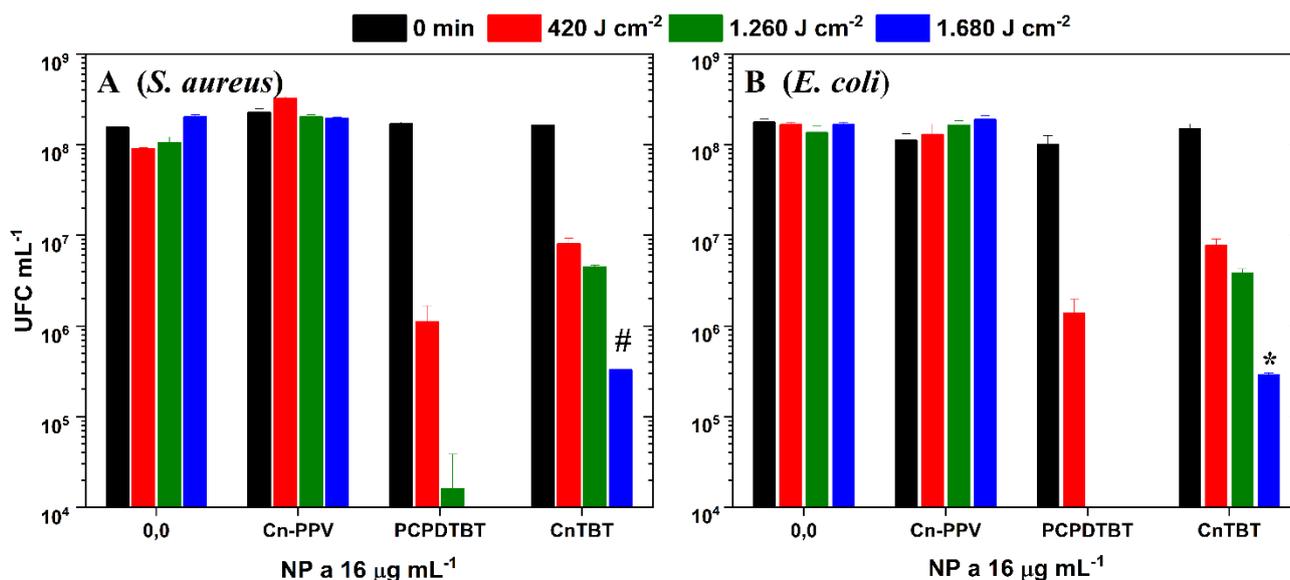


Figura 23: Contagem de unidades formadoras de colônias por mililitro (UFC mL⁻¹) de *S. aureus* (A) e *E. coli* (B) dos grupos tratados entre 0 e 20 min. Redução de # 99,84 % e * 99,83%.

Os controles negativos (concentração 0) e o grupo tratado com Cn-PPV-NPs não apresentaram reduções ao longo dos 20 min em nenhuma das bactérias, o que já era esperado devido ao conjunto (bactéria, PBS e Cn-PPV-NPs) não absorver na região do infravermelho. Na Figura 23, é mostrado que, a partir de 15 min, ambas as bactérias sofrem danos com as NPs de PCPDTBT (16 µg mL⁻¹) e com 20 min, se quer, apresentou alguma UFC. As Cn-TBT-NPs atingem redução superior a 99,8 % para ambas as bactérias com 20 min de irradiação, indicando que um tratamento com cerca de 10 min a mais poderia ser suficiente para atingir a redução de 3 log. As imagens MEV (Figura 24) mostram os danos causados nos grupos tratados com PCPDTBT-NPs e Cn-TBT-NPs de ambas as bactérias.

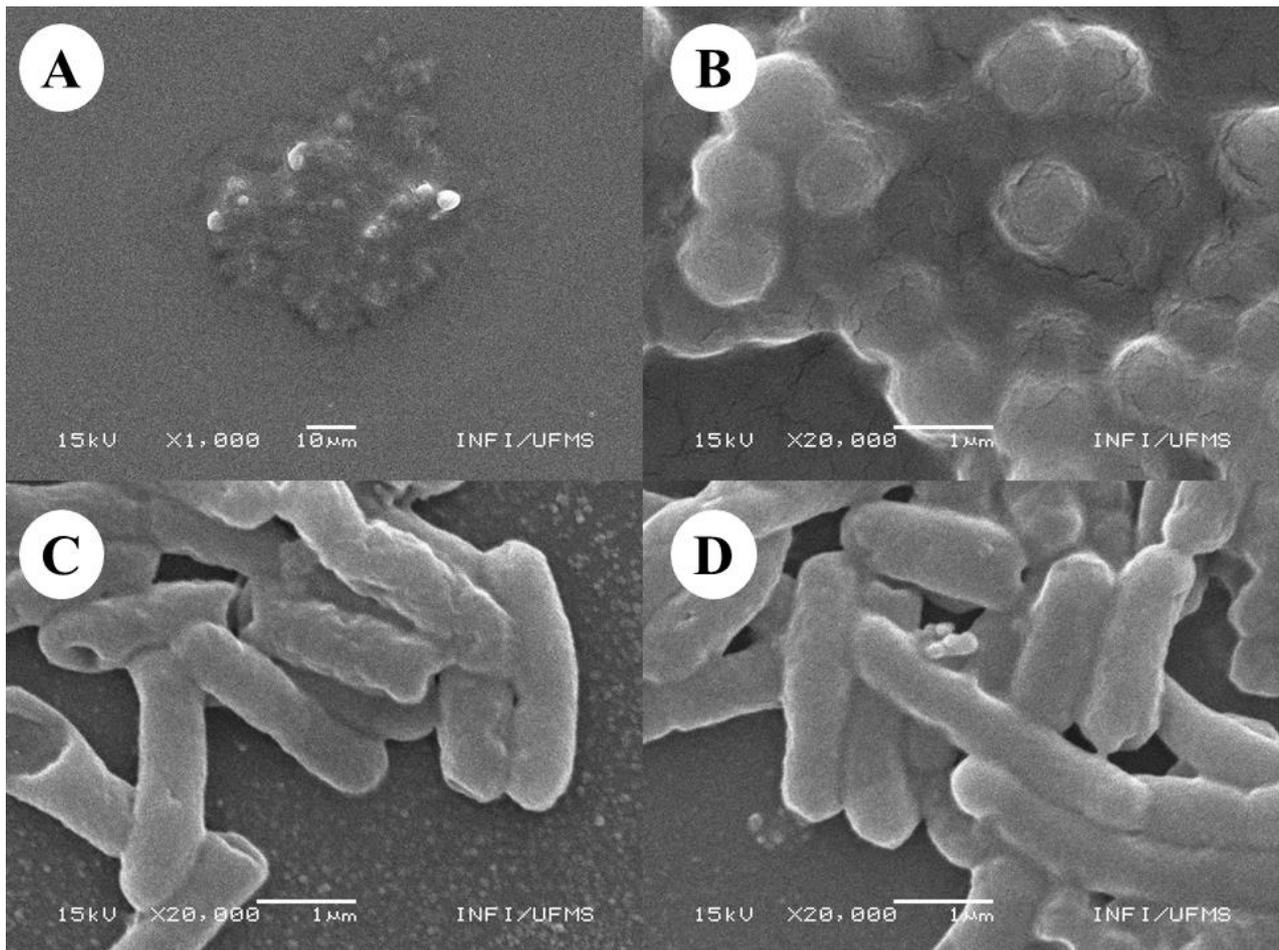


Figura 24: Imagens de microscopia eletrônica de varredura após inativação termodinâmica com laser de 806 nm, dose de radiação de 1680 J/cm² e concentrações de 16 µg mL⁻¹. Em (A) e (B) *S. aureus* tratado com PCPDTBT-NPs (completamente destruída) e Cn-TBT-NPs (superfície danificada, exibindo desintegração da membrana), respectivamente. Em (C) e (D) de *E. coli* tratada com PCPDTBT-NPs (superfície rugosa e formação de poros) e Cn-TBT-NPs (rugosidade superficial, sem evidência de porosidade), respectivamente. A concentração utilizada de NPs nos ensaios das imagens foi de 16 µg mL⁻¹, já os inoculos de baterias estavam inicialmente em 0,5 da escala Mcfarland.

A Figura 24 ilustra os danos causados por hipertermia viabilizada pelas PCPDTBT-NPs e Cn-TBT-NPs em *S. aureus* e *E. coli* após inativação fototérmica com laser de 806 nm e dose de radiação de 1680 J/cm², com concentração das NPs de 16 µg mL⁻¹. As imagens de MEV mostram os efeitos distintos nas duas bactérias. Para *S. aureus*, as PCPDTBT-NPs possibilitaram destruição celular completa (Figura 24A), enquanto as Cn-TBT-NPs viabilizaram danos na superfície, com desintegração da membrana (Figura 24B). Já em *E. coli*, as PCPDTBT-NPs induziram rugosidade

superficial e formação de poros (Figura 24C), enquanto as Cn-TBT-NPs geraram uma superfície rugosa sem evidência de porosidade (Figura 24D).

Esses resultados corroboram os dados obtidos na Figura 21, que demonstraram a eficácia das PCPDTBT-NPs em gerar um gradiente térmico significativo, suficiente para danificar as células bacterianas, especialmente quando irradiadas por laser no infravermelho. Como discutido, a capacidade de geração de calor das NPs foi crucial para o sucesso da inativação fototérmica (Zharov *et al.*, 2006). A combinação de PCPDTBT e Cn-PPV nas Cn-TBT-NPs proporcionou um efeito térmico eficaz, mas exigiu mais tempo para alcançar o mesmo nível de inativação bacteriana.

Assim, as imagens de microscopia eletrônica de varredura da Figura 24 reforçam a observação de que as PCPDTBT-NPs provocaram danos mais severos às células bacterianas, enquanto as Cn-TBT-NPs causaram danos mais sutis, mas ainda suficientes para uma redução considerável na viabilidade bacteriana. Com base nesses dados, conclui-se que a inativação fototérmica, especialmente utilizando PCPDTBT-NPs, é uma abordagem promissora para a erradicação bacteriana, com a possibilidade de otimização do tratamento com NPs compostas, como as Cn-TBT-NPs, para alcançar a eficiência desejada em tempos mais curtos (Zharov *et al.*, 2006; Al-Sharqi *et al.*, 2019).

4.6. Mecanismo de inativação

As NPs formadas, especificamente as Cn-PPV-NPs, PCPDTBT-NPs e a nova nanoestrutura micelar Cn-TBT-NPs, atuaram de maneiras distintas na fotoinativação de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, gerando diferentes quantidades de EROs, incluindo $^1\text{O}_2$, e efeitos fototérmicos que contribuíram para a inibição das bactérias.

As NPs de Cn-PPV demonstraram capacidade de geração de EROs, especialmente pelo mecanismo Tipo I. Sob irradiação com luz visível, as Cn-PPV-NPs excitam elétrons, levando à formação de radicais livres altamente reativos, como o ânion superóxido (O_2^-), que danifica as estruturas celulares bacterianas. No entanto, essas NPs necessitaram de uma concentração maior ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$) para reduzir significativamente as contagens de *S. aureus* e *E. coli*, possivelmente devido à menor capacidade de absorção em um espectro mais limitado de luz branca.

Por outro lado, as PCPDTBT-NPs são conhecidas pela combinação de efeitos fotodinâmicos e fototérmicos, gerando tanto EROs quanto calor sob irradiação. O mecanismo fotodinâmico dessas NPs envolve majoritariamente a geração EROs pelo mecanismo Tipo I, no qual a energia transferida do fotossensibilizador excitado para o oxigênio molecular produz essa espécie reativa altamente

citotóxica. A produção de $^1\text{O}_2$ contribui para a oxidação de componentes celulares essenciais, como lipídios e proteínas, resultando em danos irreversíveis nas membranas celulares bacterianas, especialmente de *E. coli*, que requer uma concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ para uma inativação significativa. Adicionalmente, o efeito fototérmico causado pelo aquecimento local das PCPDTBT-NPs amplifica o dano às bactérias. As PCPDTBT-NPs apresentaram a mesma capacidade de gerar EROs que as Cn-PPV-NPs, porém com um ganho na geração de $^1\text{O}_2$, necessitando assim de menores concentrações para efeitos fotodinâmicos.

A nova nanoestrutura micelar Cn-TBT-NPs, composta por 50% de cada polímero original (Cn-PPV e PCPDTBT), apresentou um espectro de absorção mais amplo, apresenta eficiência na geração de EROs intermediária e teve a maior taxa de geração de $^1\text{O}_2$, quando comparado com as formas nanométricas de seus polímeros isolados. Essas NPs demonstraram um efeito sinérgico entre a produção de EROs, $^1\text{O}_2$ e hipertermia, resultando em uma fotoinativação mais eficiente. Com uma concentração de apenas $8 \mu\text{g mL}^{-1}$, as Cn-TBT-NPs conseguiram inativar completamente *S. aureus*, enquanto *E. coli* exigiu uma concentração de $16 \mu\text{g mL}^{-1}$ para atingir o mesmo nível de inativação. Essa diferença na susceptibilidade pode ser atribuída à estrutura celular das bactérias, com *S. aureus* sendo Gram-positiva, apresentando menor dificuldade a penetração das NPs e permitindo a geração de $^1\text{O}_2$ e EROs diretamente dentro da bactéria. Em contraste, *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa com uma membrana externa adicional, oferece maior resistência à penetração das NPs, necessitando de maiores concentrações para sua inativação eficaz.

Assim, a maior produção de $^1\text{O}_2$ pelas Cn-TBT-NPs, em conjunto com sua capacidade de gerar calor, seu menor DHM e menor PdI as tornam mais eficazes na inativação bacteriana, exigindo assim concentrações mais baixas para atingir a MIC, reforçando o potencial dessas nanoestruturas na aIFD.

5. Conclusões

Com base nos resultados obtidos ao longo deste estudo, foi possível demonstrar que as NPs de polímeros conjugados, especificamente as de Cn-PPV, PCPDTBT e a nova micela nanoestruturada (Cn-TBT-NPs), apresentam grande potencial na fotoinativação de bactérias como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. A eficácia da nova nanoestrutura micelar foi atribuída a uma combinação de mecanismos fotodinâmicos e fototérmicos, destacando-se a capacidade de gerar EROs e $^1\text{O}_2$, fundamentais no processo de inativação bacteriana. As Cn-TBT-NPs demonstraram maior eficiência também devido ao menor DHM e PdI.

As Cn-TBT-NPs, formadas pela combinação de Cn-PPV e PCPDTBT, mostraram-se as mais promissoras, devido ao espectro de absorção mais amplo e maior eficiência na geração de EROs, incluindo o $^1\text{O}_2$, e de calor sob irradiação luminosa. Essa sinergia resultou em uma fotoinativação mais eficiente, especialmente contra *S. aureus*, que foi completamente inativada com concentrações menores ($8 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto *E. coli* exigiu concentrações mais altas ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$), em função de sua parede celular gram-negativa, sendo mais resistente à penetração de NPs.

O presente estudo destaca a importância do desenvolvimento de novas estruturas misturando polímeros cujas NPs apresentem características como agentes fotodinâmicos e fototérmicos avançados, especialmente no contexto da crescente resistência antimicrobiana. As Cn-TBT-NPs emergem como uma ferramenta poderosa na aIFD, com potencial de aplicação clínica devido à sua eficácia na inativação de microrganismos patogênicos, o que pode oferecer alternativas seguras e eficazes no tratamento de infecções bacterianas bem como aplicações contra câncer e na desinfecção de superfícies/utensílios.

Para o futuro, recomenda-se a otimização dessas formulações, a realização de estudos de toxicidade em células de mamíferos ou modelos equivalentes, além de estudos *in vivo* para explorar melhor seu potencial terapêutico e por último seria recomendável análises para entender se a micela se trata de uma simples mistura ou da geração de um novo copolímero. A pesquisa contínua nesse campo é crucial, pois a combinação de propriedades ópticas e fototérmicas das NPs representa um caminho promissor para o desenvolvimento de novas abordagens no combate à resistência antimicrobiana, ao câncer e para aplicações tecnológicas de diagnóstico.

6. Referências

Abelha, T.F. *et al.* (2019) ‘Low molecular weight PEG–PLGA polymers provide a superior matrix for conjugated polymer nanoparticles in terms of physicochemical properties, biocompatibility and optical/photoacoustic performance’, *Journal of Materials Chemistry B*, 7(33), pp. 5115–5124. Available at: <https://doi.org/10.1039/C9TB00937J>.

Ackroyd, R. *et al.* (2001) ‘The History of Photodetection and Photodynamic Therapy’, *Photochemistry and Photobiology*, 74(5), p. 656. Available at: [https://doi.org/10.1562/0031-8655\(2001\)074<0656:THOPAP>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1562/0031-8655(2001)074<0656:THOPAP>2.0.CO;2).

Agel, M.R. *et al.* (2019) ‘Curcumin loaded nanoparticles as efficient photoactive formulations against gram-positive and gram-negative bacteria’, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 178, pp. 460–468. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.03.027>.

Allison, R.R. and Sibata, C.H. (2010) ‘Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review’, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 7(2), pp. 61–75. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>.

- Almeida, Mateus Lima *et al.* (2023) ‘Resistência bacteriana: uma ameaça global’, *Brazilian Journal of Health Review*, 6(5), pp. 19741–19748. Available at: <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n5-028>.
- Al-Sharqi, A. *et al.* (2019) ‘Enhancement of the Antibacterial Efficiency of Silver Nanoparticles against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria Using Blue Laser Light’, *International Journal of Photoenergy*, 2019, pp. 1–12. Available at: <https://doi.org/10.1155/2019/2528490>.
- Alves de Oliveira Kézia Cristine Barbosa Ferreira Nádia Rezende Barbosa Raposo, B. *et al.* (2018) ‘Preparação de sistemas nanoparticulados para a solubilização e incorporação de ativos hidrofóbicos’, *Principia: Caminhos da Iniciação Científica*, 18(2), pp. 10–10. Available at: <https://doi.org/10.34019/2179-3700.2018.V18.29870>.
- Alves, J.W. da S. (2021) ‘ANTIBIÓTICOS E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA BACTERIANA: UMA QUESTÃO DE SAÚDE PÚBLICA’, in *Anais do I Congresso Nacional de Microbiologia Clínica On-Line*. Revista Multidisciplinar em Saúde. Available at: <https://doi.org/10.51161/rem/1195>.
- Aminov, R. (2017) ‘History of antimicrobial drug discovery: Major classes and health impact’, *Biochemical Pharmacology*, 133, pp. 4–19. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2016.10.001>.
- Arvizo, R.R. *et al.* (2011) ‘Modulating Pharmacokinetics, Tumor Uptake and Biodistribution by Engineered Nanoparticles’, *PLoS ONE*, 6(9), p. e24374. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024374>.
- Bachir, G. and Abouni, B. (2015) ‘Escherichia coli and Staphylococcus aureus most common source of infection’.
- Banerji, N. *et al.* (2010) ‘Exciton Formation, Relaxation, and Decay in PCDTBT’, *Journal of the American Chemical Society*, 132(49), pp. 17459–17470. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja105290e>.
- Barolet, D. (2008) ‘Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology’, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 27(4), pp. 227–238. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.sder.2008.08.003>.
- Barreto, A.C. de A. (2023) ‘O USO DO LED COMO POTENCIALIZADOR NO TRATAMENTO DA ACNE VULGAR: UMA REVISÃO DE LITERATURA’, *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 9(11), pp. 3021–3027. Available at: <https://doi.org/10.51891/rease.v9i11.11779>.
- Bekmukhametova, A. *et al.* (2020) ‘Photodynamic therapy with nanoparticles to combat microbial infection and resistance’, *Nanoscale*, 12(41), pp. 21034–21059. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0NR04540C>.
- Bell, V. (2019) ‘Medicamentos e vida privada na primeira metade do século xx: o combate às infecções antes e depois da penicilina’, *Revista Portuguesa de História*, 47, pp. 359–379. Available at: https://doi.org/10.14195/0870-4147_47_17.
- Berezin, M.Y. and Achilefu, S. (2010) ‘Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging’, *Chemical Reviews*, 110(5), pp. 2641–2684. Available at: <https://doi.org/10.1021/cr900343z>.
- Beveridge, T. (2001) ‘Use of the Gram stain in microbiology’, *Biotechnic & Histochemistry*, 76(3), pp. 111–118. Available at: <https://doi.org/10.1080/bih.76.3.111.118>.

- Bissani, F.M. *et al.* (2024) ‘Avaliação da organização molecular de filmes finos de ftalocianina de gadolínio antes e após annealing’, *OBSERVATÓRIO DE LA ECONOMÍA LATINOAMERICANA*, 22(5), p. e4805. Available at: <https://doi.org/10.55905/oelv22n5-145>.
- Blecher, K., Nasir, A. and Friedman, A. (2011) ‘The growing role of nanotechnology in combating infectious disease’, *Virulence*, 2(5), pp. 395–401. Available at: <https://doi.org/10.4161/viru.2.5.17035>.
- Brumfitt, W. and Hamilton-Miller, J. (1989) ‘Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*’, *New England Journal of Medicine*, 320(18), pp. 1188–1196. Available at: <https://doi.org/10.1056/NEJM198905043201806>.
- Bruna C. S. Pinto *et al.* (2022) ‘Desenvolvimento de um Método de Nanoprecipitação para o Aprisionamento de Fármaco em nanopartículas de Poli-e- Caprolactona’, *Revista Processos Químicos*, 17(31), pp. 65–69. Available at: <https://doi.org/10.19142/rpq.v17i31.632>.
- Caires, Anderson R.L., Lima, T.H.N. and Abelha, T.F. (2023) ‘Conjugated polymer nanoparticles with tunable antibacterial photodynamic capability’, *Materials Advances*, 4(7), pp. 1664–1670. Available at: <https://doi.org/10.1039/d2ma00970f>.
- Caires, Anderson R. L., Lima, T.H.N. and Abelha, T.F. (2023) ‘Conjugated polymer nanoparticles with tunable antibacterial photodynamic capability’, *Materials Advances*, 4(7), pp. 1664–1670. Available at: <https://doi.org/10.1039/D2MA00970F>.
- Caires, C.S.A. *et al.* (2020) ‘Photodynamic Inactivation of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* by a Natural Food Colorant (E-141ii)’, *Molecules*, 25(19), p. 4464. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules25194464>.
- Caires, C.S.A. *et al.* (2024) ‘Photoinactivation of Multidrug-Resistant *mcr-1* -Positive *E. coli* Using PCPDTBT Conjugated Polymer Nanoparticles under White Light’, *ACS Applied Bio Materials* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsabm.4c01049>.
- Cambón, A. *et al.* (2013) ‘Cytocompatibility and P-glycoprotein Inhibition of Block Copolymers: Structure–Activity Relationship’, *Molecular Pharmaceutics*, 10(8), pp. 3232–3241. Available at: <https://doi.org/10.1021/mp4002848>.
- Campbell, E.J. *et al.* (1994) ‘Biocompatible Surfaces Using Methacryloylphosphorylcholine Laurylmethacrylate Copolymer’, *ASAIO Journal*, 40(3), pp. M853–M857. Available at: <https://doi.org/10.1097/00002480-199407000-00118>.
- Carvalho, J.J.V. de *et al.* (2021) ‘Bactérias multirresistentes e seus impactos na saúde pública: Uma responsabilidade social’, *Research, Society and Development*, 10(6), p. e58810616303. Available at: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i6.16303>.
- Castilho, P.F. de *et al.* (2024) ‘Desafios e alternativas promissoras na luta contra a resistência antimicrobiana’, *Revista Eletrônica Acervo Saúde*, 24(5), p. e15237. Available at: <https://doi.org/10.25248/reas.e15237.2024>.
- Castro, C.A. *et al.* (2012) ‘Photocatalytic production of $1O_2$ and OH mediated by silver oxidation during the photoinactivation of *Escherichia coli* with TiO_2 ’, *Journal of Hazardous Materials*, 211–212, pp. 172–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2011.08.076>.
- Catorze, M.G. (2009) ‘Laser: fundamentos e indicações em dermatologia’.

- Chen, Z. *et al.* (2013) ‘UV-Vis Spectroscopy’, in, pp. 49–62. Available at: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8298-7_5.
- Colaneri, N.F. *et al.* (1990) ‘Photoexcited states in poly(*p*-phenylene vinylene): Comparison with *trans*, *trans*-distyrylbenzene, a model oligomer’, *Physical Review B*, 42(18), pp. 11670–11681. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.42.11670>.
- Corrêa, L.T. *et al.* (2020) ‘CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS PRINCIPAIS ANTIMICROBIANOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA’, *Revista Intertox de Toxicologia, Risco Ambiental e Sociedade*, 13(2), pp. 38–47. Available at: <https://doi.org/10.22280/revintervol13ed2.453>.
- Cristina, G.P.R. e L., PAULA, L.C.A.G. DE and RODRIGUES, G.P. (2023) ‘STAPHYLOCOCCUS AUREUS NO AMBIENTE HOSPITALAR’, in *Anais do IV Congresso Brasileiro de Ciências Biológicas On-line*. Revista Multidisciplinar de Educação e Meio Ambiente. Available at: <https://doi.org/10.51189/conbracib2023/16933>.
- Cruz, L.F. da *et al.* (2021) ‘Avaliação do perfil de sensibilidade de Escherichia coli isoladas de infecção do trato urinário aos antimicrobianos’, *Research, Society and Development*, 10(10), p. e184101018742. Available at: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18742>.
- Cugnasca, B.S. and Dos Santos, A.A. (2021) ‘FLUORESCÊNCIA: PRINCÍPIOS E ALGUMAS APLICAÇÕES’, in *9º Workshop do Mestrado Profissional Instituto de Química Universidade de São Paulo*. Editora Blucher, pp. 71–79. Available at: <https://doi.org/10.5151/9786555501407-06>.
- Cui, Y. *et al.* (2012) ‘The molecular mechanism of action of bactericidal gold nanoparticles on Escherichia coli’, *Biomaterials*, 33(7), pp. 2327–2333. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.11.057>.
- Cunha, H.P. da and Baiense, A.S.R. (2023) ‘USO DE VANCOMICINA NO TRATAMENTO DE INFECÇÕES CAUSADAS POR STAPHYLOCOCCUS AUREUS RESISTENTE À METICILINA (MRSA)’, *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 9(4), pp. 9242–9258. Available at: <https://doi.org/10.51891/rease.v9i4.9642>.
- Dougherty, T.J. *et al.* (1998) ‘Photodynamic Therapy’, *JNCI Journal of the National Cancer Institute*, 90(12), pp. 889–905. Available at: <https://doi.org/10.1093/jnci/90.12.889>.
- DUBOZ, J.-Y. (1999) ‘Matériaux semi-conducteurs à grand gap III-V à base de GaN’, *Électronique* [Preprint]. Available at: <https://doi.org/10.51257/a-v1-e1995>.
- Du, C. *et al.* (2021) ‘Polymeric photothermal agents for cancer therapy: recent progress and clinical potential’, *Journal of Materials Chemistry B*, 9(6), pp. 1478–1490. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0TB02659J>.
- Eroy-Reveles, A.A. and Mascharak, P.K. (2009) ‘Nitric Oxide-Donating Materials and Their Potential in Pharmacological Applications for Site-Specific Nitric Oxide Delivery’, *Future Medicinal Chemistry*, 1(8), pp. 1497–1507. Available at: <https://doi.org/10.4155/fmc.09.111>.
- Espinosa, M.F. *et al.* (2020) ‘Systematic review and meta-analysis of time-temperature pathogen inactivation’, *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 230, p. 113595. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2020.113595>.

- Etzold, F. *et al.* (2012) ‘The Effect of Solvent Additives on Morphology and Excited-State Dynamics in PCPDTBT:PCBM Photovoltaic Blends’, *Journal of the American Chemical Society*, 134(25), pp. 10569–10583. Available at: <https://doi.org/10.1021/ja303154g>.
- Facchinatto, W.M. *et al.* (2022) ‘Antimicrobial and Photoantimicrobial Activities of Chitosan/CNPPV Nanocomposites’, *International Journal of Molecular Sciences*, 23(20), p. 12519. Available at: <https://doi.org/10.3390/ijms232012519>.
- Farhat, A., Di Mascio, P. and Pedroso, C. (2023) ‘Generation And Detection Of Singlet Oxygen (1O₂) By Upconversion Nanoparticles (UCNP)’, *Free Radical Biology and Medicine*, 208, p. S121. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2023.10.275>.
- Farjami, A. *et al.* (2021) ‘The Factors Determining the Skin Penetration and Cellular Uptake of Nanocarriers: New Hope for Clinical Development’, *Current Pharmaceutical Design*, 27(42), pp. 4315–4329. Available at: <https://doi.org/10.2174/1381612827666210810091745>.
- Fedatto Abelha, T. and Rodrigues Lima Caires, A. (2021) ‘Light-Activated Conjugated Polymers for Antibacterial Photodynamic and Photothermal Therapy’, *Advanced NanoBiomed Research*, 1(7), p. 2100012. Available at: <https://doi.org/10.1002/ANBR.202100012>.
- Felício, L.B.A. de *et al.* (2008) ‘A terapia fotodinâmica com ácido 5-aminolevulínico como modalidade de tratamento para neoplasias cutâneas não-melanoma’, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 83(4), pp. 309–316. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962008000400004>.
- Feng, L. *et al.* (2013) ‘Conjugated polymer nanoparticles: preparation, properties, functionalization and biological applications’, *Chemical Society Reviews*, 42(16), p. 6620. Available at: <https://doi.org/10.1039/c3cs60036j>.
- Ferreira, M. *et al.* (2023) ‘Epidemiology of bacteremia in a pediatric population – A 10-year study’, *Enfermedades infecciosas y microbiología clinica (English ed.)*, 41(2), pp. 85–91. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.eimce.2021.06.006>.
- Fischer, F.S.U. *et al.* (2013) ‘Influence of Processing Solvents on Optical Properties and Morphology of a Semicrystalline Low Bandgap Polymer in the Neutral and Charged States’, *Macromolecules*, 46(12), pp. 4924–4931. Available at: <https://doi.org/10.1021/ma400939z>.
- Freitas, F.B.F. de and Machado, A.L. (2018) ‘Caracterização fenotípica do perfil de resistência a antimicrobianos em cepas de Escherichia coli isoladas de carne moída em feiras livres da região do Alto Oeste Potiguar, Rio Grande do Norte’, *Brazilian Journal of Food Research*, 9(2), p. 30. Available at: <https://doi.org/10.3895/rebrapa.v9n2.5654>.
- Furuya, E.Y. and Lowy, F.D. (2006) ‘Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting’, *Nature Reviews Microbiology*, 4(1), pp. 36–45. Available at: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1325>.
- Gao, Q. *et al.* (no date) ‘Enhanced visible photocatalytic oxidation activity of perylene diimide/g-C₃N₄ n-n heterojunction via π - π interaction and interfacial charge separation’, 271, p. 118933. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.apcatb.2020.118933>.
- Gao, Y. *et al.* (2023) ‘Nanomaterial-based photodynamic therapy for antibacterial applications: a comprehensive review’, *Frontiers in Materials*, 10. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmats.2023.1260887>.

- Garapati, C. *et al.* (2023) ‘Photodynamic therapy: A special emphasis on nanocarrier-mediated delivery of photosensitizers in antimicrobial therapy’, *Arabian Journal of Chemistry*, 16(4), p. 104583. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.104583>.
- Garcez, A.S. *et al.* (2020) ‘Effects of antimicrobial photodynamic therapy on antibiotic-resistant *Escherichia coli*’, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 32, p. 102029. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102029>.
- Garcia, P.R. de A.F. (2020) *Rotas de síntese e métodos de caracterização estrutural para sistemas de nanopartículas metálicas*. Universidade de São Paulo. Available at: <https://doi.org/10.11606/T.43.2020.tde-24032020-185222>.
- Ge, X., Liu, J. and Sun, L. (2017) ‘Controlled optical characteristics of lanthanide doped upconversion nanoparticles for emerging applications’, *Dalton Transactions*, 46(48), pp. 16729–16737. Available at: <https://doi.org/10.1039/C7DT03049E>.
- Gholami, L. *et al.* (2023) ‘Clinical applications of antimicrobial photodynamic therapy in dentistry’, *Frontiers in Microbiology*, 13. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.1020995>.
- Grey, J.K. *et al.* (2006) ‘Size-Dependent Spectroscopic Properties of Conjugated Polymer Nanoparticles’, *The Journal of Physical Chemistry B*, 110(51), pp. 25568–25572. Available at: <https://doi.org/10.1021/jp065990a>.
- Hamblin, M.R. (2002) ‘Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 49(6), pp. 941–951. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkf053>.
- Henderson, B.W. and Dougherty, T.J. (1992) ‘HOW DOES PHOTODYNAMIC THERAPY WORK?’, *Photochemistry and Photobiology*, 55(1), pp. 145–157. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.1992.tb04222.x>.
- Hinze, F., Ripperger, S. and Stintz, M. (1999) ‘Praxisrelevante Zetapotentialmessung mit unterschiedlichen Meßtechniken’, *Chemie Ingenieur Technik*, 71(4), pp. 338–347. Available at: <https://doi.org/10.1002/cite.330710405>.
- H. Neu (1994) ‘Emerging trends in antimicrobial resistance in surgical infections. A review’, *The European journal of surgery. Supplement.* - PMID: 7524800 [Preprint].
- Holmes, A.H. *et al.* (2016) ‘Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance’, *The Lancet*, 387(10014), pp. 176–187. Available at: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(15\)00473-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(15)00473-0).
- Huang, X. *et al.* (2017) ‘High Prevalence of Colistin Resistance and *mcr-1* Gene in *Escherichia coli* Isolated from Food Animals in China’, *Frontiers in Microbiology*, 8. Available at: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00562>.
- Imberti, C. *et al.* (2020) ‘Synthesis and in vivo evaluation of PEG-BP–BaYbF5 nanoparticles for computed tomography imaging and their toxicity’, *Journal of Materials Chemistry. B*, 8(34), p. 7723. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0TB00969E>.
- Issa, M.C.A. and Manela-Azulay, M. (2010) ‘Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica’, *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 85(4), pp. 501–511. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0365-05962010000400011>.

- Jim O'Neill (2014) *Antimicrobial Resistance: Tackling a crisis for the health and wealth of nations*, https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf. Available at: https://amr-review.org/sites/default/files/AMR%20Review%20Paper%20-%20Tackling%20a%20crisis%20for%20the%20health%20and%20wealth%20of%20nations_1.pdf (Accessed: 12 September 2024).
- Junior, N. (2020) 'Phosphate Buffered Saline (PBS) v1'. Available at: <https://doi.org/10.17504/protocols.io.bfyppjvn>.
- Kahya, N. (2019) 'Water Soluble Chitosan Derivatives and their Biological Activities: A Review', *Polymer Sciences*, 05(01). Available at: <https://doi.org/10.36648/2471-9935.5.1.44>.
- Kang, S. *et al.* (2022) 'Review of Conjugated Polymer Nanoparticles: From Formulation to Applications', *ACS Applied Nano Materials*, 5(12), pp. 17436–17460. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsanm.2c04730>.
- Kashef, N., Huang, Y.-Y. and Hamblin, M.R. (2017) 'Advances in antimicrobial photodynamic inactivation at the nanoscale', *Nanophotonics*, 6(5), pp. 853–879. Available at: <https://doi.org/10.1515/nanoph-2016-0189>.
- Kavanagh, K.T. (2019) 'Control of MSSA and MRSA in the United States: protocols, policies, risk adjustment and excuses', *Antimicrobial Resistance & Infection Control*, 8(1), p. 103. Available at: <https://doi.org/10.1186/s13756-019-0550-2>.
- Kemal, E. *et al.* (2017) 'Bright, near infrared emitting PLGA–PEG dye-doped CN-PPV nanoparticles for imaging applications', *RSC Advances*, 7(25), pp. 15255–15264. Available at: <https://doi.org/10.1039/C6RA25004A>.
- Klaseboer, E. and Chan, D.Y.C. (2020) 'On the derivation of the Smoluchowski result of electrophoretic mobility', *Journal of Colloid and Interface Science*, 568, pp. 176–184. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2020.02.032>.
- Klein, M. *et al.* (2020) 'Advanced nanomedicine characterization by DLS and AF4-UV-MALS: Application to a HIV nanovaccine', *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 179, p. 113017. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2019.113017>.
- Laviña, E.H., Angulo, L.J.S. and Saez, V. (2004) 'Mecanismos de liberación de fármacos desde materiales polímeros', in. Available at: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:169381857>.
- Lazzari, S. *et al.* (2012) 'Colloidal stability of polymeric nanoparticles in biological fluids', *Journal of Nanoparticle Research*, 14(6), p. 920. Available at: <https://doi.org/10.1007/s11051-012-0920-7>.
- Leventis, A. *et al.* (2018) 'Highly Luminescent Encapsulated Narrow Bandgap Polymers Based on Diketopyrrolopyrrole', *Journal of the American Chemical Society*, 140(5), pp. 1622–1626. Available at: <https://doi.org/10.1021/jacs.7b13447>.
- Li, A. *et al.* (2011) 'Superhydrophobic conjugated microporous polymers for separation and adsorption', *Energy & Environmental Science*, 4(6), p. 2062. Available at: <https://doi.org/10.1039/c1ee01092a>.
- Li, L., Sun, J. and He, Z. (2013) 'Deep Penetration of Nanoparticulate Drug Delivery Systems into Tumors: Challenges and Solutions', *Current Medicinal Chemistry*, 20(23), pp. 2881–2891. Available at: <https://doi.org/10.2174/09298673113209990004>.

- Lima, A.R. *et al.* (2022) ‘Photoinactivation of *Aedes aegypti* larvae using riboflavin as photosensitizer’, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 39. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.103030>.
- LIMA, M.F.P., B.M.A., P.R.S., V.J.R.C., & D.O.M.E. (2015) ‘Staphylococcus aureus E AS INFECÇÕES HOSPITALARES – REVISÃO DE LITERATURA.’, 21.
- Lima, R.B.W. e *et al.* (2021) ‘Terapia fotodinâmica no tratamento endodôntico: Uma revisão integrativa’, *Research, Society and Development*, 10(9), p. e48610918142. Available at: <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i9.18142>.
- Liu, X. *et al.* (2018) ‘Zeta Potential of Beta Zeolites: Influence of Structure, Acidity, pH, Temperature and Concentration’, *Molecules*, 23(4), p. 946. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules23040946>.
- Liyanage, D.D. *et al.* (2016) ‘An Analysis of Nanoparticle Settling Times in Liquids’, *Journal of Nanomaterials*, 2016, pp. 1–7. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/7061838>.
- Macneill, C.M. *et al.* (2013) ‘Low band gap donor-acceptor conjugated polymer nanoparticles and their NIR-mediated thermal ablation of cancer cells’, *Macromolecular bioscience*, 13(1), pp. 28–34. Available at: <https://doi.org/10.1002/MABI.201200241>.
- Mancuso, G. *et al.* (2021) ‘Bacterial Antibiotic Resistance: The Most Critical Pathogens’, *Pathogens*, 10(10), p. 1310. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens10101310>.
- Martins, M.G. (2017) ‘Encapsulamento de nanopartículas magnéticas em polímeros acrílicos e avaliação de hipertermia para potencial tratamento de câncer’.
- Mayoral, B., Moreno, A.C. and Martín-Martínez, E. (2014) ‘Potencial zeta en la determinación de carga superficial de liposomas.’, *Latin-American Journal of Physics Education* [Preprint].
- Melo, W. de C.M.A. de and Perussi, J.R. (2012a) ‘Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos’, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* [Preprint].
- Melo, W. de C.M.A. de and Perussi, J.R. (2012b) ‘Comparando inativação fotodinâmica e antimicrobianos’, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* [Preprint].
- Méndez-Pfeiffer, P.A. *et al.* (2019) ‘Damage on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* using white light photoactivation of Au and Ag nanoparticles’, *Journal of Applied Physics*, 125(21). Available at: <https://doi.org/10.1063/1.5090273>.
- Meng, H.-F. (1998) ‘Excimers in light-emitting conjugated polymers’, *Physical Review B*, 58(7), pp. 3888–3892. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.58.3888>.
- Messner, K.R. and Imlay, J.A. (1999) ‘The Identification of Primary Sites of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation in the Aerobic Respiratory Chain and Sulfite Reductase Complex of *Escherichia coli*’, *Journal of Biological Chemistry*, 274(15), pp. 10119–10128. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.274.15.10119>.
- Metryka, O. *et al.* (2023) ‘Undesirable consequences of the metallic nanoparticles action on the properties and functioning of *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus epidermidis* membranes’, *Journal of Hazardous Materials*, 446, p. 130728. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2023.130728>.

Mironov, A.F. (1996) ‘Second-generation photosensitizers based on natural chlorines and bacteriochlorines’, in A. V. Ivanov and M.A. Kazaryan (eds), pp. 150–164. Available at: <https://doi.org/10.1117/12.229483>.

Modicano, P. *et al.* (2020) ‘Enhanced optical imaging properties of lipid nanocapsules as vehicles for fluorescent conjugated polymers’, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 154, pp. 297–308. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2020.07.017>.

Moliton, A. and Hiorns, R.C. (2004) ‘Review of electronic and optical properties of semiconducting π -conjugated polymers: applications in optoelectronics’, *Polymer International*, 53(10), pp. 1397–1412. Available at: <https://doi.org/10.1002/pi.1587>.

Moreira, A.P.G. and Rinaldi Neto, S. (2024) ‘ESTUDO DA RESISTÊNCIA DE BACTÉRIAS A ANTIBIÓTICOS E NOVOS MÉTODOS DE TRATAMENTO’, *Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação*, 10(6), pp. 2755–2764. Available at: <https://doi.org/10.51891/rease.v10i6.14590>.

Neves, K.J. da S. *et al.* (2022) ‘Sistemas de entrega de drogas baseados em nanotecnologia: nanopartículas poliméricas para tratamento de câncer / Nanotechnology-based drug delivery systems: review of recent nanodrug development for cancer treatment’, *Brazilian Journal of Development*, 8(4), pp. 24770–24787. Available at: <https://doi.org/10.34117/bjdv8n4-139>.

Nguyen, B.T. *et al.* (2006) ‘Enhancing the Photoluminescence Intensity of Conjugated Polycationic Polymers by Using Quantum Dots as Antiaggregation Reagents’, *Langmuir*, 22(10), pp. 4799–4803. Available at: <https://doi.org/10.1021/la053399j>.

Nikhil John, K. and Arnepalli, D.N. (2019) ‘Factors Influencing Zeta Potential of Clayey Soils’, in, pp. 171–178. Available at: https://doi.org/10.1007/978-981-13-0899-4_21.

Nogueira, J.O.S. *et al.* (2023) ‘Staphylococcus aureus resistente em unidade de terapia intensiva’, *Research, Society and Development*, 12(6), p. e7312642006. Available at: <https://doi.org/10.33448/rsd-v12i6.42006>.

Noronha, M.L. de C. (2015) ‘Síntese de Copolímeros anfífilicos: relação entre estrutura molecular e agregação em solução aquosa’.

Oba, T. (2007) ‘Photosensitizer Nanoparticles for Photodynamic Therapy’, *Current Bioactive Compounds*, 3(4), pp. 239–251. Available at: <https://doi.org/10.2174/157340707783220248>.

O’Connor, A.E., Gallagher, W.M. and Byrne, A.T. (2009) ‘Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy’, *Photochemistry and Photobiology*, 85(5), pp. 1053–1074. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2009.00585.x>.

Oliveira, K.G. and Machado, F.C. (2023) ‘Tipos de lasers e suas aplicações na clínica geral odontológica e odontopediátrica: revisão de literatura’, *Brazilian Journal of Implantology and Health Sciences*, 5(4), pp. 2769–2788. Available at: <https://doi.org/10.36557/2674-8169.2023v5n4p2769-2788>.

de Oliveira Lacerda Fonseca, M., Ramos Soares, C. and Barcelos Valiatti, T. (2023) ‘PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DE Escherichia coli ISOLADAS DE INFECÇÃO DO TRATO URINÁRIO EM RONDÔNIA’, *Interfaces Científicas - Saúde e Ambiente*, 9(2), pp. 411–423. Available at: <https://doi.org/10.17564/2316-3798.2023v9n2p411-423>.

Oliveira, M.E. de F.A.G. de, Peixoto, C.A. and Amorim, R.V. da S. (2019) ‘Ultrastructural Analysis of Chitosan Antibacterial Activity against Clinical Isolates of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*’, *Advances in Microbiology*, 09(10), pp. 893–903. Available at: <https://doi.org/10.4236/aim.2019.910055>.

OMS, O.M. da S. (2022) *Relatório sinaliza aumento da resistência a antibióticos em infecções bacterianas em humanos e necessidade de melhores dados, organização mundial de saúde*. Available at: <https://www.who.int/news/item/09-12-2022-report-signals-increasing-resistance-to-antibiotics-in-bacterial-infections-in-humans-and-need-for-better-data> (Accessed: 1 August 2024).

Onorato, G. *et al.* (2022) ‘Optical Control of Tissue Regeneration through Photostimulation of Organic Semiconducting Nanoparticles’, *Advanced Healthcare Materials*, 11(19). Available at: <https://doi.org/10.1002/adhm.202200366>.

Ormond, A. and Freeman, H. (2013) ‘Dye Sensitizers for Photodynamic Therapy’, *Materials*, 6(3), pp. 817–840. Available at: <https://doi.org/10.3390/ma6030817>.

Patel, T. and Levitin, A. (2014) ‘*Escherichia Coli* Adaptive Resistance to Clinical Antibiotics’.

Peris-Fajarnés, G. *et al.* (2018) ‘Capture and analysis of autofluorescence in biological tissues for identification and demarcation of lesions.’, in *Proceedings INNODOCT/18. International Conference on Innovation, Documentation and Education*. València: Editorial Universitat Politècnica de València. Available at: <https://doi.org/10.4995/INN2018.2018.8914>.

Perussi, J.R. (2007) ‘Inativação fotodinâmica de microrganismos’, *Química Nova*, 30(4), pp. 988–994. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000400039>.

Puig, J.E. (1999) ‘Synthesis and applications of nanoparticles via microemulsion polymerization’, *Revista Mexicana De Física*, 45, pp. 18–20. Available at: <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:101676889>.

Pulingam, T. *et al.* (2022) ‘Exploring Various Techniques for the Chemical and Biological Synthesis of Polymeric Nanoparticles’, *Nanomaterials*, 12(3), p. 576. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano12030576>.

Rabadan, K.K.G. (2020a) ‘Desarrollo de nanopartículas a partir de polímeros y moléculas con estructura donador-aceptor: estudio de su fluorescencia originada por la absorción de uno y dos fotones’.

Rabadan, K.K.G. (2020b) ‘Desarrollo de nanopartículas a partir de polímeros y moléculas con estructura donador-aceptor: estudio de su fluorescencia originada por la absorción de uno y dos fotones’.

Rani, D.J. *et al.* (2020) ‘Chitosan nanoparticle-mediated delivery of curcumin and phycocyanin for photodynamic therapy against biofilm forming bacteria’, *Materials Express*, 10(11), pp. 1854–1870. Available at: <https://doi.org/10.1166/mex.2020.1861>.

Ratti, R.P. and Sousa, C.P. (2009) ‘*Staphylococcus aureus* metilina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais’, *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 30(2), pp. 137–143. Available at: <https://rcfba.fcfar.unesp.br/index.php/ojs/article/view/436> (Accessed: 17 December 2024).

Rauscher, U. *et al.* (1990) ‘Exciton versus band description of the absorption and luminescence spectra in poly(*p*-phenylenevinylene)’, *Physical Review B*, 42(16), pp. 9830–9836. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.42.9830>.

- Rengifo-Herrera, J.A. *et al.* (2007) ‘A Comparison of Solar Photocatalytic Inactivation of Waterborne *E. coli* Using Tris (2,2'-bipyridine)ruthenium(II), Rose Bengal, and TiO₂’, *Journal of Solar Energy Engineering*, 129(1), pp. 135–140. Available at: <https://doi.org/10.1115/1.2391319>.
- Ribeiro, J.N. and Jorge, R.A. (2005) ‘Determinação do mecanismo de destruição de células mediado por meso-tetramesitylporfirina, octaetilporfirina, octaetilporfirina de vanadil e luz visível’, *Eclética Química*, 30(1), pp. 7–13. Available at: <https://doi.org/10.1590/S0100-46702005000100001>.
- Rychtowski, P. *et al.* (2022) ‘Impact of TiO₂ Reduction and Cu Doping on Bacteria Inactivation under Artificial Solar Light Irradiation’, *Molecules*, 27(24), p. 9032. Available at: <https://doi.org/10.3390/molecules27249032>.
- Saini, N., Pandey, K. and Awasthi, K. (2021) ‘Conjugate polymer-based membranes for gas separation applications: current status and future prospects’, *Materials Today Chemistry*, 22, p. 100558. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2021.100558>.
- Sales, L.M. and Silva, T. (2012) ‘Staphylococcus aureus METICILINA RESISTENTE: UM DESAFIO PARA A SAÚDE PÚBLICA’, *Acta Biomedica Brasiliensia* [Preprint].
- Salviano Silva de Oliveira, R. *et al.* (2023a) ‘APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO ENDODÔNTICO: REVISÃO INTEGRATIVA’, *Revista Formadores*, 20(Suplementar), p. e2001. Available at: <https://doi.org/10.25194/rf.v20iSuplementar.2001>.
- Salviano Silva de Oliveira, R. *et al.* (2023b) ‘APLICAÇÃO DA TERAPIA FOTODINÂMICA ANTIMICROBIANA NO TRATAMENTO ENDODÔNTICO: REVISÃO INTEGRATIVA’, *Revista Formadores*, 20(Suplementar), p. e2001. Available at: <https://doi.org/10.25194/rf.v20iSuplementar.2001>.
- Sansone, P. *et al.* (2022) ‘Cefiderocol for Carbapenem-Resistant Bacteria: Handle with Care! A Review of the Real-World Evidence’, *Antibiotics*, 11(7), p. 904. Available at: <https://doi.org/10.3390/antibiotics11070904>.
- Schwarz, S. and Johnson, A.P. (2016) ‘Transferable resistance to colistin: a new but old threat: Table 1.’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(8), pp. 2066–2070. Available at: <https://doi.org/10.1093/jac/dkw274>.
- Sena, N. da S. *et al.* (2022) ‘Infecções hospitalares em Unidade de Terapia Intensiva: Uma revisão integrativa’, *Research, Society and Development*, 11(10), p. e353111032591. Available at: <https://doi.org/10.33448/RSD-V11I10.32591>.
- Senge, M.O. and Brandt, J.C. (2011) ‘Temoporfin (Foscan® , 5,10,15,20-Tetra(*m* - hydroxyphenyl)chlorin)—A Second-generation Photosensitizer †, ‡’, *Photochemistry and Photobiology*, 87(6), pp. 1240–1296. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2011.00986.x>.
- Setlik, J. and Silva, R. (2016) ‘O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não-melanoma’.
- Sharma, S.K. *et al.* (2012) ‘Photodynamic Therapy for Cancer and for Infections: What Is the Difference?’, *Israel Journal of Chemistry*, 52(8–9), pp. 691–705. Available at: <https://doi.org/10.1002/ijch.201100062>.

Sheng, L., Li, X. and Wang, L. (2022) ‘Photodynamic inactivation in food systems: A review of its application, mechanisms, and future perspective’, *Trends in Food Science and Technology*. Elsevier Ltd, pp. 167–181. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2022.04.001>.

Sherwood, G.A. *et al.* (2010) ‘Chain Length and Substituent Effects on the Formation of Excimer-Like States in Nanoaggregates of CN-PPV Model Oligomers’, *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(28), pp. 12078–12089. Available at: <https://doi.org/10.1021/jp100517n>.

Silva, S. (2010) ‘Propriedades Ópticas e Elétricas de Semicondutores Orgânicos à Base de Polímeros Conjugados’.

Silva, V.B. da *et al.* (2021) ‘Terapia fotodinâmica no tratamento de lesões em câncer de pele não melanoma: revisão integrativa’, *Research, Society and Development*, 10(1), p. e7410111257. Available at: <https://doi.org/10.33448/RSD-V10I1.11257>.

Slavin, Y.N. *et al.* (2017) ‘Metal nanoparticles: understanding the mechanisms behind antibacterial activity’, *Journal of Nanobiotechnology*, 15(1), p. 65. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12951-017-0308-z>.

Soci, C. *et al.* (2007) ‘Photoconductivity of a Low-Bandgap Conjugated Polymer’, *Advanced Functional Materials*, 17(4), pp. 632–636. Available at: <https://doi.org/10.1002/adfm.200600199>.

Soini, E., Lövgren, T. and Reimer, C.B. (1987) ‘Time-Resolved Fluorescence of Lanthanide Probes and Applications in Biotechnology’, *C R C Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 18(2), pp. 105–154. Available at: <https://doi.org/10.1080/10408348708542802>.

Soliman, N. *et al.* (no date) ‘Encapsulation of a Ru(II) Polypyridyl Complex into Polylactide Nanoparticles for Antimicrobial Photodynamic Therapy’, 12(10), p. 961. Available at: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12100961>.

Soos, Z.G. *et al.* (1993) ‘Excitation and relaxation energies of *trans* -stilbene: Confined singlet, triplet, and charged bipolarons’, *Physical Review B*, 47(4), pp. 1742–1753. Available at: <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.47.1742>.

Souza, M.V., Reis, C. and Pimenta, F.C. (2007) ‘REVISÃO SOBRE A AQUISIÇÃO GRADUAL DE RESISTÊNCIA DE Staphylococcus aureus AOS ANTIMICROBIANOS’, *Revista de Patologia Tropical*, 34(1). Available at: <https://doi.org/10.5216/rpt.v34i1.2134>.

Spagnolo, A.M. (2024) ‘Bacterial Infections: Surveillance, Prevention and Control’, *Pathogens*, 13(2), p. 181. Available at: <https://doi.org/10.3390/pathogens13020181>.

v. Tappeiner, H. (1903) ‘Ueber die Wirkung fluorescirender Substanzen auf Fermente und Toxine’, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 36(3), pp. 3035–3038. Available at: <https://doi.org/10.1002/CBER.19030360370>.

Tenover, F. (2006) ‘Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria.’, *American Journal of Infection Control* [Preprint].

T. H. N. Lima (2023) ‘Síntese, caracterização e avaliação do potencial fotossensibilizador de nanopartículas do polímero conjugado PCPDTBT visando a fotoinativação de bactérias’. Available at: <https://repositorio.ufms.br/jspui/retrieve/8ae37df8-4bb9-4ba0-afdc-027e0afeb96a/Disserta%20C3%A7%C3%A3o-Thalita%20HN%20Lima%20-%20FINAL%20assinada.pdf> (Accessed: 21 October 2024).

- Tuncel, D. (2019) ‘ π -Conjugated nanostructured materials: preparation, properties and photonic applications’, *Nanoscale Advances*, 1(1), pp. 19–33. Available at: <https://doi.org/10.1039/C8NA00108A>.
- Usacheva, M. *et al.* (2016) ‘Nanoparticle-Mediated Photodynamic Therapy for Mixed Biofilms’, *Journal of Nanomaterials*, 2016, pp. 1–11. Available at: <https://doi.org/10.1155/2016/4752894>.
- Vilaça, R.M.A. *et al.* (2023a) ‘Fotossensibilizadores de origem natural: extração, caracterização e recentes avanços na fotoinativação bacteriana’, *Brazilian Journal of Health Review*, 6(5), pp. 23436–23457. Available at: <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n5-405>.
- Vilaça, R.M.A. *et al.* (2023b) ‘Fotossensibilizadores de origem natural: extração, caracterização e recentes avanços na fotoinativação bacteriana’, *Brazilian Journal of Health Review*, 6(5), pp. 23436–23457. Available at: <https://doi.org/10.34119/bjhrv6n5-405>.
- Volarić, J. *et al.* (2021) ‘Molecular photoswitches in aqueous environments’, *Chemical Society Reviews*, 50(22), pp. 12377–12449. Available at: <https://doi.org/10.1039/D0CS00547A>.
- Wang, D. *et al.* (2018) ‘Synthesis of Self-Assembled Porphyrin Nanoparticle Photosensitizers’, *ACS Nano*, 12(4), pp. 3796–3803. Available at: <https://doi.org/10.1021/acsnano.8b01010>.
- Wang, H. *et al.* (2010) ‘Enhancement of TAT cell membrane penetration efficiency by dimethyl sulphoxide’, *Journal of Controlled Release*, 143(1), pp. 64–70. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2009.12.003>.
- Wang, S. *et al.* (2016) ‘Surfactant-free, low band gap conjugated polymer nanoparticles and polymer:fullerene nanohybrids with potential for organic photovoltaics’, *Nanotechnology*, 27(24), p. 245601. Available at: <https://doi.org/10.1088/0957-4484/27/24/245601>.
- Wang, S.-G., Chen, Yen-Chun and Chen, Yu-Chie (2018) ‘Antibacterial Gold Nanoparticle-Based Photothermal Killing of Vancomycin-Resistant Bacteria’, *Nanomedicine*, 13(12), pp. 1405–1416. Available at: <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0380>.
- Web of science* (2024). Available at: <https://www-webofscience-com.ez51.periodicos.capes.gov.br/wos/woscc/basic-search> (Accessed: 18 December 2024).
- WHO (2023) *Antimicrobial resistance*.
- WHO (2024) *WHO updates list of drug-resistant bacteria most threatening to human health*.
- Wu, W. *et al.* (2017) ‘A Highly Efficient and Photostable Photosensitizer with Near-Infrared Aggregation-Induced Emission for Image-Guided Photodynamic Anticancer Therapy’, *Advanced Materials*, 29(33). Available at: <https://doi.org/10.1002/adma.201700548>.
- Yadav, K. *et al.* (2022) ‘Techniques For Increasing Solubility: A Review Of Conventional And New Strategies’, *Asian Journal of Pharmaceutical Research and Development*, 10(2), pp. 144–153. Available at: <https://doi.org/10.22270/ajprd.v10i2.1054>.
- Youssef, F. *et al.* (2020) ‘Comparative Study of Antibacterial Effects of Titanium Dioxide Nanoparticles Alone and in Combination with Antibiotics on MDR *Pseudomonas aeruginosa* Strains’, *International Journal of Nanomedicine*, Volume 15, pp. 3393–3404. Available at: <https://doi.org/10.2147/IJN.S246310>.

- Yukawa, H. and Baba, Y. (2017) 'In Vivo Fluorescence Imaging and the Diagnosis of Stem Cells Using Quantum Dots for Regenerative Medicine', *Analytical Chemistry*, 89(5), pp. 2671–2681. Available at: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.6b04763>.
- Zanatta, A.R. (2019) 'Revisiting the optical bandgap of semiconductors and the proposal of a unified methodology to its determination', *Scientific Reports*, 9(1), p. 11225. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47670-y>.
- Zanetti-Ramos, B.G. *et al.* (2010) 'Characterization of Polymeric Particles with Electron Microscopy, Dynamic Light Scattering, and Atomic Force Microscopy', *Particulate Science and Technology*, 28(5), pp. 472–484. Available at: <https://doi.org/10.1080/02726351.2010.504133>.
- Zhang, H. *et al.* (2020) 'Dual-Mode Antibacterial Conjugated Polymer Nanoparticles for Photothermal and Photodynamic Therapy', *Macromolecular Bioscience*, 20(2). Available at: <https://doi.org/10.1002/mabi.201900301>.
- Zhang, P. *et al.* (2017) 'Surveillance of antimicrobial resistance among Escherichia coli from chicken and swine, China, 2008–2015', *Veterinary Microbiology*, 203, pp. 49–55. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2017.02.008>.
- Zhang, Y. *et al.* (2020) 'Influence of the Spatial Distribution of Cationic Functional Groups at Nanoparticle Surfaces on Bacterial Viability and Membrane Interactions', *Journal of the American Chemical Society*, 142(24), pp. 10814–10823. Available at: <https://doi.org/10.1021/jacs.0c02737>.
- Zhao, M. *et al.* (2023) 'The Role of Stabilizing Copolymer in Determining the Physicochemical Properties of Conjugated Polymer Nanoparticles and Their Nanomedical Applications', *Nanomaterials*, 13(9), p. 1543. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano13091543>.
- Zhao, Y. *et al.* (2010) 'Adsorbed Tween 80 is unique in its ability to improve the stability of gold nanoparticles in solutions of biomolecules', *Nanoscale*, 2(10), p. 2114. Available at: <https://doi.org/10.1039/c0nr00309c>.
- Zharov, V.P. *et al.* (2006) 'Photothermal Nanotherapeutics and Nanodiagnostics for Selective Killing of Bacteria Targeted with Gold Nanoparticles', *Biophysical Journal*, 90(2), pp. 619–627. Available at: <https://doi.org/10.1529/biophysj.105.061895>.
- Zhou, Y. *et al.* (2002) 'Synthesis of Novel Stable Nanometer-Sized Metal (M = Pd, Au, Pt) Colloids Protected by a π -Conjugated Polymer', *Langmuir*, 18(1), pp. 277–283. Available at: <https://doi.org/10.1021/la011323r>.
- Zong, T.-X. *et al.* (2022) 'Recent Advances in Antimicrobial Nano-Drug Delivery Systems', *Nanomaterials*, 12(11), p. 1855. Available at: <https://doi.org/10.3390/nano12111855>.

