

RESSALVA

Atendendo solicitação do (a) autor (a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 19/02/2021.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**“Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas poliméricas
para encapsulação de um novo derivado de antraquinona de
origem biotecnológica ”**

Camila Fernanda Amantino

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco

Araraquara – SP

2019



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
DEPARTAMENTO DE BIOPROCESSOS E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**“Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas poliméricas
para encapsulação de um novo derivado de antraquinona de
origem biotecnológica ”**

Camila Fernanda Amantino

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco

Araraquara- SP

2019

Ficha Catalográfica

Elaborada Por Diretoria Técnica de Biblioteca e
Documentação Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- A484d** Amantino, Camila Fernanda.
Desenvolvimento e caracterização de nanoestruturas poliméricas para
encapsulação de um novo derivado de antraquinona de origem biotecnológica /
Camila Fernanda Amantino. – Araraquara, 2019.
78 f. : il.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita
Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em
Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa em Desenvolvimento de Fármacos e
Medicamentos.
- Orientador: Fernando Lucas Primo.
Coorientador: Antônio Claudio Tedesco.
1. Corantes biotecnológicos. 2. Nanocápsulas. 3. Fotoquímica. 4. Fotofísica.
5. Espectroscopia. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Tedesco, Antônio Claudio,
coorient. III. Título.

CAPES: 33004030078P6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOPROCESSOS	18
2.2. ANTRAQUINONAS	20
2.3. NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS NANOCARREADORES	24
2.3.1. NANOEMULSÕES	26
2.3.2. NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	27
3. OBJETIVOS	Erro! Indicador não definido.
3.1. OBJETIVO GERAL	Erro! Indicador não definido.
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	Erro! Indicador não definido.
4. MATERIAIS E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido.
4.1. MATERIAIS	Erro! Indicador não definido.
4.2. PROTOCOLO DE PREPARO DE NANOEMULSÃO CONTENDO CORANTE VERMELHO	Erro! Indicador não definido.
4.3. PROTOCOLO DE PREPARO DA NANOCÁPSULA POLIMÉRICA CONTENDO CORANTE VERMELHO E FTALOCIANINA DE CLORO ALUMÍNIO (CIAIPc)	Erro! Indicador não definido.
4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E NANOCAPSULAS	Erro! Indicador não definido.
4.4.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	Erro! Indicador não definido.
4.4.2. CARACTERIZAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES COM USO DO LUMISIZER	Erro! Indicador não definido.
4.5. ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS.	Erro! Indicador não definido.
4.6. LINEARIDADE DO CORANTE VERMELHO: MÉTODO ESPECTROANALÍTICO	Erro! Indicador não definido.
4.6.1. QUANTIFICAÇÃO DE CV E CIAIPc EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	Erro! Indicador não definido.
4.7. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO CV E CIAIPc NAS NC	Erro! Indicador não definido.
4.8. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA	Erro! Indicador não definido.
4.9. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL ATRAVÉS DO TESTE DE MTT	Erro! Indicador não definido.
4.10. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR USANDO METODO DA RESAZURINA	Erro! Indicador não definido.
5. RESULTADO E DISCUSSÕES	Erro! Indicador não definido.

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS	Erro!
Indicador não definido.	
5.1.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	Erro! Indicador não definido.
5.1.2. CARACTERIZAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES COM USO DO LUMISIZER	Erro! Indicador não definido.
5.1.3. ESTUDOS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	Erro! Indicador não definido.
5.2. ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS PARA OS ATIVOS LIVRES E NANOENCAPSULADOS	Erro! Indicador não definido.
5.4. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DO CV E CIAIPCc NAS NC	Erro! Indicador não definido.
5.5. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA	Erro! Indicador não definido.
5.6. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE EM CULTURA CELULAR DE LINHAGEM DE FIBROBLASTOS DE MURINO	Erro! Indicador não definido.
6. CONCLUSÕES	30
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA	31

RESUMO

Os materiais nanoestruturados têm potencial diferente em comparação com outros materiais em maior escala, resultando em diferentes características e propriedades físico-químicas. Inicialmente foram preparadas nanoemulsões (NE) contendo corante vermelho (CV) um derivado de antraquinona, produzido pelo cultivo do fungo *Talaromyces marssonii* em mesa incubadora rotativa, no entanto as NE com corante vermelho (CV/NE) não apresentaram características físico-químicas desejadas (tamanho de partícula ≤ 250 nm, índice de polidispersividade $\leq 0,3$), partindo-se então para a utilização de nanocápsulas poliméricas (NC) como sistemas carreadores para este ativo. Foram preparadas amostras de NC vazias (Vazia/NC), com corante vermelho (CV/NC), com corante vermelho associado a ftalocianina de cloro alumínio (CV_CIAIPc/NC) e somente com ftalocianina de cloro alumínio (CIAIPc/NC). Estes nanomateriais foram caracterizados e apresentaram características físico-químicas adequadas, com tamanho de partícula < 250 nm, índice de polidispersividade $\leq 0,3$ e potencial Zeta predominantemente negativo. As análises de estabilidade acelerada apresentaram um tempo vida de armazenamento > 3 meses para todas as NC. As análises de microscopia por força atômica (MFA) realizadas para CV/NC e CV_CIAIPc/NC mostram uma morfologia esférica para ambas as NC e tamanho de partícula de 104 nm para CV/NC e 211nm para CV_CIAIPc/NC, as análises por diferença de fase mostraram que a superfície da partícula é homogênea, ou seja, composta somente pelo poli-láctico-co-glicólico (PLGA) e também é possível afirmar que não há presença de ativo livre no meio das NC. Foram realizadas análises por espectroscópicas de absorção e de emissão de fluorescência UV-visível as quais não mostraram alterações nas propriedades fotofísicas no estado estacionário do CV livre e da CIAIPc livre em comparação com CV/NC, CV_CIAIPc/NC e CIAIPc/NC, foi possível estabelecer um método analítico para a quantificação do corante baseado na curva de correlação entre a absorção máxima em função da concentração de CV na faixa de 1,0 a 20 $\mu\text{g/ml}$ onde foi obtido um coeficiente de correlação da ordem de 0,999. Foram quantificadas todas as NC as quais apresentaram uma taxa de incorporação entre 60 -70 %, e eficiência de encapsulação de 100%, resultado comprovado pela análise de diferença de fase por microscopia de força atômica (MFA). Foram realizadas também análises de tempo de vida de fluorescência, as quais apresentarem ajuste multiexponencial para CV/DMSO_ACN, CV/NC e CV_CIAIPc/NC, apresentando dois tempos de vidas quando excitados em 470 nm e ajuste monoexponencial para CV_CIAIPc/NC e CIAIPc/NC, apresentando apenas um tempo de vida quando excitados em 640 nm. Os ensaios de viabilidade celular mostram ausência de citotoxicidade para CV livre e para as NC, com uma viabilidade maior que 93%. Os resultados obtidos neste trabalho indicam que as nanocápsulas poliméricas apresentaram grande potencial como nanoestrutura para encapsulação do CV e quando associado a CIAIPc. As NC apresentaram estabilidade, características físico-químicas desejadas, e alta eficiência de encapsulação dos ativos, além de não apresentarem citotoxicidade para células saudáveis, dando assim suporte para estudos futuros para diversas aplicações biológica e/ou biomédica.

Palavras-chaves: Corantes biotecnológicos. Nanocápsulas. Fotoquímica. Fotofísica. Espectroscopia.

ABSTRACT

Nanostructured materials have different potential compared to other materials on a larger scale, resulting in different physico-chemical characteristics and properties. Initially NE were prepared containing red dye (RD) an anthraquinone derivative produced by cultivating the *Talaromyces minioluteus* fungus on rotary incubator table. However, the RD/NE have not shown the desired physical-chemical characteristics, starting with the use of nanocapsules as carrier systems for this active. Empty NC samples (blank / NC), with red dye (RD / NC), with red dye associated with phthalocyanine chlorine aluminum (RD_CIAIPc / NC) and with phthalocyanine chlorine aluminum (CIAIPc / NC) were prepared. These nanomaterials were characterized and presented adequate physico-chemical characteristics, with particle size <250 nm, polydispersity index ≤ 0.3 and Zeta potential predominantly negative. The accelerated stability analyzes showed a shelf life > 3 months for all NCs. Atomic force microscopy (MFA) analyzes performed for RD / NC and RD_CIAIPc / NC show a spherical morphology for both NC and particle size of 104 nm for RD / NC and 211nm for RD_CIAIPc / NC. The difference analysis of phase showed that the particle surface is homogeneous, that is, composed only of polylactic-co-glycolic acid (PLGA) and it is possible to affirm that there is no free active in the NC medium. UV-visible spectroscopic absorption and emission spectroscopic analyzes were performed which did not show changes in the free-stationary photophysical properties of free RD and free CIAIPc compared to RD / NC, RD_CIAIPc / NC and CIAIPc / NC. It was possible to establish an analytical method for the quantification of the dye based on the correlation curve between the maximum absorption as a function of the concentration of RD in the range of 1.0 to 20 $\mu\text{g} / \text{mL}$ where a correlation coefficient of the order of 0,999 . It was quantified all the NCs which had an incorporation rate between 60-70%, and encapsulation efficiency of 100%, a result evidenced by phase difference analysis by atomic force microscopy (MFA). Fluorescence life-time analyzes were performed, which present a multiexponential adjustment for RD / DMSO_ACN, RD / NC and RD_CIAIPc / NC, with two lifetimes when excited at 470 nm and monoexponential adjustment for RD_CIAIPc / NC and CIAIPc / NC , presenting only a lifetime when excited at 640 nm. Cell viability assays show absence of cytotoxicity for free RD and for NC, with viability greater than 93%. The results obtained in this work indicate that the polymeric nanocapsules presented great potential as nanostructure for RD encapsulation and when associated with CIAIPc. NC showed stability, desired physical-chemical characteristics, and high efficiency of encapsulation of the active, besides not presenting cytotoxicity to healthy cells, thus supporting future studies for several biological and / or biomedical applications.

Key words: biotechnological dyes. Nanocapsules. Photochemistry. Photophysic. Spectroscopy.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIAGRAMA DE JABLONSKI SIMPLIFICADO, ILUSTRANDO AS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS QUE DÃO ORIGEM AOS MECANISMOS DA TFD E FOTOPROCESSOS. Φ_F : RENDIMENTO QUÂNTICO DE FLUORESCÊNCIA; Φ_T : RENDIMENTO QUÂNTICO DE TRIPLET O; Φ_{ISC} : RENDIMENTO QUÂNTICO DE CRUZAMENTO INTER-SISTEMAS; Φ_{IC} : RENDIMENTO QUÂNTICO DE CONVERSÃO INTERNA; Φ_{Δ} : RENDIMENTO QUÂNTICO DE OXIGÊNIO SINGLET O; S_0 : ESTADO SINGLET O FUNDAMENTAL; S_1 : ESTADO SINGLET O EXCITADO.	20
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS ANTRAQUINONAS	21
FIGURA 3 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS: CONVENCIONAL X CONTROLADA (LIBERAÇÃO SUSTENTADA, TERAPIA CONVENCIONAL)	25
FIGURA 4 PRINCIPAIS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS UTILIZADOS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA.	26
FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA NANOEMULSÃO DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA.....	27
FIGURA 6 - ESQUEMA DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS: (A) FÁRMACO DISSOLVIDO NO NÚCLEO OLEOSO DAS NANOCÁPSULAS; B) FÁRMACO ADSORVIDO À PAREDE POLIMÉRICA DAS NANOCÁPSULAS.	28
FIGURA 7 ESQUEMA DE PREPARO NANOEMULSÕES.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURE 8 ESQUEMA DE PREPARO DAS NANOCÁPSULAS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA - 9 REPRESENTAÇÃO DO EQUIPAMENTO LUMISIZER UTILIZADO PARA NAS MEDIDAS DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS NANOCÁPSULAS. FONTE: DKSH TECHNOLOGY PTE LTD - COPYRIGHT © 2016.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 10 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA VAZIA/NC.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 11 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA CV/NC.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 12 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA CV_CLALPC/NC.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 13 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA CLALPC/NC.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 14 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA VAZIA/NC, CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 15 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA CV/NC, CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 16 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA CV_CLALPC/NC, CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
FIGURA 17 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA CV_CLALPC/NC CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

- FIGURE 18** INTEGRAL DA TRANSMISSÃO NA DEPENDÊNCIA DE TEMPO (S) PARA DIFERENTES AMOSTRAS DE NANOCÁPSULAS USANDO LUMISIZER A 2616 XG POR 4,5 H. A T = 25 °C **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 19** - FOTOMICROGRAFIAS TRIDIMENSIONAIS E BIDIMENSIONAIS OBTIDAS DAS FORMULAÇÕES CV/NC (A) E CV_CLALPC/NC (B) POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 20** - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E PERFIL TOPOGRÁFICO DADA PELA ANÁLISE DO SOFTWARE MOSTRANDO MEDIÇÕES DO DIÂMETRO E ALTURA DAS CV/NC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 21** - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E PERFIL TOPOGRÁFICO DADA PELA ANÁLISE DO SOFTWARE MOSTRANDO MEDIÇÕES DO DIÂMETRO E ALTURA DAS CV_CLALPC/NC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 22** - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E HISTOGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS PARA CV/NC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 23** - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E HISTOGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS PARA CV_CLALPC/NC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 24** - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL DAS ANÁLISES DE DIFERENÇA DE FASE DA CV/NC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 25** - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL DAS ANÁLISES DE DIFERENÇA DE FASE DA CV_CLALPC/NC. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 26** - ESPECTRO DE ABSORÇÃO (A) E ABSORÇÃO NORMALIZADA (B) NO UV/VIS DO CV/DMSO E CV/NC, COM MÁXIMOS DE ABSORÇÃO EM 430 NM E 505 NM PARA CV/ DMSO E 428 E 503 NM PARA CV/NC/DMSO. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 27** - ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA (A) E EMISSÃO NORMALIZADA (B) NO UV-VIS DO CV/DMSO E DO CV/NC NA CONCENTRAÇÃO DE 0,1 MG/ML, COM COMPRIMENTO DE EXCITAÇÃO DE 480 NM PARA AMBOS, TEMPO DE INTEGRAÇÃO DE 0,5 S E FENDAS DE 3,0/3,0 NM PARA EXCITAÇÃO E EMISSÃO, RESPECTIVAMENTE. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 28** - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NORMALIZADA NO UV/VIS PARA O (A) CV, CLALPC E CV+CLALPC EM DMSO E (B) CV/NC, CLALPC/NC, CV_CLALPC/NC E CV_CLALPC/NC + CV EM DMSO. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 29** - ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NORMALIZADA NO UV-VIS (A) CV/DMSO COM EXCITAÇÃO EM 480NM, CLALPC/DMSO COM EXCITAÇÃO EM 615 NM E CV/CLALPC COM EXCITAÇÃO EM 480 NM E 615NM (B) CV/NC EM DMSO COM EXCITAÇÃO EM 480 NM, CLALPC/NC EM DMSO COM EXCITAÇÃO EM 615 NM CV_CLALPC/NC EM DMSO, COM COMPRIMENTOS DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 480 NM E 615 NM, TEMPO DE INTEGRAÇÃO DE 0,5 S E FENDAS DE 3,0/3,0 NM PARA EXCITAÇÃO E EMISSÃO, RESPECTIVAMENTE. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 30** - CONJUNTOS DE ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV- VIS EM SOLUÇÃO DMSO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (1,0 A 20 MG/ML). CURVA DE CORRELAÇÃO ENTRE A ABSORÇÃO MÁXIMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE NA FAIXA DE 1,0 A 20 MG/ML. $Y = 0,0061X + 0,0064$ $R^2 = 0,9991$, $N = 3$. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 31** - DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA DO CV/NC E CV/DMSO_ACN, COM COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO FIXADO EM 470 NM. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

- FIGURA 32** - DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA PARA CLALPC/DMSO E CLALPC/NC, COM COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO FIXADO EM 540 NM. **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 33** DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA DO CV_CLALPC/ NC, COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 640 NM..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 34** - DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA DO CV_CLALPC/NC, COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 470 NM..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 35** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV LIVRE EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO MTT, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 2,5 µG/ML, B = 5,0 µG/ML, C = 15 µG/ML, D = 25 µG/ML E E = 50 µG/ML. A SIGNIFICÂNCIA ESTADÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 36** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO MTT, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 5,0 µG/ML, B = 15 µG/ML, C = 25 µG/ML E D = 50 µG/ML. A SIGNIFICÂNCIA ESTADÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 37** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO REZASURINA, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 5,0 µG/ML, B = 15 µG/ML, C= 25 µG/ML E D =50 µG/ML. A SIGNIFICÂNCIA ESTADÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 38** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO MTT, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 2,5 µG/ML E 12 µG/ML (2,5%), B = 5,0 µG/ML E 25 µG/ML (5%), C = 15 µG/ML E 25 µG/ML (15%), D = 25 µG/ML E 75 µG/ML (25%) E = 50 µG/ML E 250 µG/ML (50%). A SIGNIFICÂNCIA ESTADÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05). **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**
- FIGURA 39** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINHO USANDO REZASURINA, ONDE CT = CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 5,0 µG/ML E 25 µG/ML (5%), B = 15 µG/ML E 25 µG/ML (15%), C= 25 µG/ML E 75 µG/ML (25%) E D = 50 µG/ML E 250 µG/ML (50%) E = 50% DE VAZIA/NC. A SIGNIFICÂNCIA ESTADÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05)..... **ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.**

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 ANTRAQUINONAS COMERCIALIZADAS.....	22
TABELA 2 - DADOS DE TAMANHO DE PARTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE E POTENCIAL ZETA DAS NANOEMULSÕES CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CV	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
TABELA 3 - PARÂMETROS ANALISADOS DA NANOEMULSÃO COM CV A 0,1MG/ML NO 1ºDIA E APÓS 7 DIAS ...	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
TABELA 4 - DADOS DE TAMANHO DEPARTÍCULA, PDI E POTENCIAL ZETA DAS NANOCÁPSULAS EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
TABELA 5 - TAXA DE SEPARAÇÃO REPRESENTADA PELA INCLINAÇÃO E CALCULADA PELO SOFTWARE SEPVIEW 5.1, DEPOIS DE INTEGRAR OS ARQUIVOS DE TRANSMISSÃO.	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
TABELA 6 - RESULTADO DOS TEMPOS DE VIDA DE PRATELEIRA (SHELF-LIFE) DE CADA AMOSTRA	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.
TABELA 7 - TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA (τ) PARA AS AMOSTRAS ESTUDADAS NOS DIFERENTES AMBIENTES QUÍMICOS.....	ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.

LISTA DE ABREVIATURAS

- ϕ_{Δ} Rendimento quântico de oxigênio singlete
- τ_f Tempo de vida de fluorescência
- ϕ_F Rendimento quântico de fluorescência
- ACN Acetonitrila
- AFM do inglês *Atomic Force Microscopy* (microscopia de força atômica)
- CIAIPc Ftalocina de Cloro e Alumínio
- CIAIPc/NC Nanocápsula com ftalocianina de cloro e alumínio
- CV Corante vermelho
- CV/NC Nanocápsula com corante vermelho
- CV_CIAIPc/NC Nanocápsula com corante vermelho e ftalocianina de cloro e alumínio
- d Tamanho médio de partícula
- DMSO Dimetil Sulfóxido
- EPM Erro padrão médio
- EROS Espécies reativas de oxigênio
- FBS do inglês *Fetal bovine serum* (Soro fetal bovino)
- FLIM do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (Microscópio de fluorescência confocal com resolução do tempo)
- FS Fotossensibilizador
- LP Lipossoma
- LPc Concentração de corante presente no sobrenadante da amostra.
- MFA Microscopia de força atômica
- MTT Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio
- NC Nanocápsula
- NE Nanoemulsão
- nm Nanômetros
- PCL Policaprolactona
- PdI do inglês *polydispersity index* (Índice de polidispersão)
- PGA Ácido poli-glicólico
- PLA Ácido poli-láctico
- PLGA Poli-láctico-co-glicólico
- RCF do inglês *relative centrifugal force* (Força centrífuga relativa)
- RD do inglês *Red Dye* (corante vermelho)

S⁰ Estado fundamental

S¹ Estado singleto excitado

T¹ Estado tripleto excitado

TCSPC do inglês *Time-Correlated Single Photon Counting*

TFD Terapia Fotodinâmica

TPc Concentração total de corante na formulação

TTTR do inglês *Time-Tagged Time-Resolved*

Vazia/NC Nanocápsula vazia

ξ Potencial Zeta

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, por todos esses anos de ensinamentos, amizade e a confiança para desenvolver esta pesquisa.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco, pelos ensinamentos, pela disponibilidade do seu laboratório que sempre esteve de portas abertas para auxiliar na realização desta pesquisa.

A minha família pelo amor incondicional e sem limites, apoio e incentivo.

Ao meu melhor amigo, amor, companheiro e marido, Thiago, por me apoiar e ajudar a superar os desafios, com muita paciência e amor, tornando os meus dias mais felizes e leves e principalmente por estar sempre ao meu lado e nunca deixar que eu desistisse e à sua família pelo apoio e carinho.

Aos amigos Daniela, Denise, Ana, Bruna, Cassamo, Luciana, Rodrigo, e Ariela pela amizade sincera, pelos conselhos e pelos ótimos momentos de convivência durante estes anos de companheirismo. Aos técnicos Adriana, Ana, Flavio e Matheus pelo profissionalismo, pela amizade e pela disposição em ajudar. À todos os amigos do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da UNESP e aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina da USP pelo companheirismo e pela ótima convivência.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma forma terapêutica inovadora que se baseia na combinação de luz monocromática e composto fotossensibilizador para o tratamento de diversas patologias dando ênfase a neoplasias e doenças de pele como Bowen, psoríase, carcinoma baso/epicelular (JIN et al., 2015; O'CONNELL; OKHOVAT; ZEITOUNI, 2018; MU et al., 2018). O sucesso da TFD como método complementar aos procedimentos tradicionais se consolidou nos anos 2000, expandindo-se inclusivamente para terapias estéticas e de rejuvenescimento que baseiam na utilização de luz monocromática de menor energia (AHMED et al., 2018). A TFD possui muitas vantagens aos métodos tradicionais frente o tratamento do câncer, o que a caracteriza como menos invasiva, além de não necessitar de grandes estruturas hospitalares para sua aplicação, com destaque no tratamento de diversas doenças seja como terapia única ou complementar aos protocolos terapêuticos convencionais, e tem sido utilizada com bastante sucesso nas áreas oncológica, e também dermatológica, ginecológica e odontológica (LUO et al., 2017).

O mecanismo da TFD consiste basicamente na aplicação de uma molécula fotossensível chamada de fotossensibilizador, seguida de irradiação, em um comprimento de onda específico, com absorção de energia desencadeando uma série de reações fotoquímicas que levam a produção de radicais livres, destacando-se o oxigênio singlete (1O_2) e espécies reativas de oxigênio (EROS) que levam a destruição do tecido alvo (LI et al., 2017a).

Os fotossensibilizadores são corantes (naturais ou sintéticos), capazes de absorverem luz em um comprimento de onda específico, desencadeando uma série de reações que resultam na produção de 1O_2 e EROS (KWIATKOWSKI et al., 2018). Neste contexto, destacam-se as antraquinonas, uma classe de corantes naturais que possuem a capacidade de absorverem luz, e de produzir essas espécies reativas de oxigênio (MONTROYA et al., 2005).

O uso de corantes e pigmentos de origem natural são amplamente conhecidos desde a antiguidade, com destaque na indústria têxtil, na forma de ingredientes alimentícios, em cosméticos e nutracêuticos, e também no tratamento de determinadas doenças (VELHO et al., 2017; SOUISSI; GUESMI; MOUSSA, 2018). Entretanto, a descoberta de corantes sintéticos fez com que os corantes naturais fossem esquecidos por um tempo, e desta forma os corantes sintéticos trouxeram muitas surpresas como problemas ambientais decorrente de poluição e toxicidade em efluentes e mananciais que são utilizados como locais de descarte irregular de rejeitos industriais. Assim, a necessidade de controle de descartes e a busca pela correta postura industrial diante nos novos marcos regulatórios para questões ambientais fez com que os

corantes naturais ganhassem interesse novamente, obviamente por possuírem certas vantagens, e principalmente por serem sustentáveis e renováveis, resultando em impacto ambiental mínimo (SHAHID et al., 2013).

Os corantes de origem natural ganharam grande interesse das indústrias farmacêuticas, de cosméticos, de alimentos e têxtil, nos últimos anos, não somente pela sua propriedade de coloração, mas principalmente por também possuírem propriedades e funções complementares, as quais conferem características especiais aos produtos, tais como atividades bioativas, inseticidas, fungicidas, antioxidantes e reguladores de crescimento microbológico (DUVAL et al., 2016; GUPTA et al., 2015). Estes compostos, geralmente, são economicamente atraentes para o setor industrial, visto que na maioria dos casos, são biodegradáveis, além de serem obtidos a partir de fontes renováveis e sustentáveis (SOUISSI; GUESMI; MOUSSA, 2018).

Dentre esses corantes, as antraquinonas ganham grande destaque, uma vez que constituem o maior grupo de corantes descobertos, cerca de 700 compostos descritos, além de possuírem grande variedade de estrutura e formas de obtenção (DUVAL et al., 2016; GHOSH; JOSE; KAUSHIK, 2016). As antraquinonas também possuem uma variedade de propriedades farmacológicas, tais como, atividade anti-inflamatória, anticâncer, antioxidante antibacteriano, antifúngicos, antiviral, neuroprotetores e laxativa, com isso o interesse pelo desenvolvimento e descobertas de novos derivados de antraquinonas, que possuem atividades biológicas, é constante e de grande importância econômica (MALIK e MÜLLER, 2016).

No entanto, as antraquinonas possuem certas desvantagens quanto a sua administração para o aproveitamento dessas propriedades bioativas, tais como, baixa solubilidade em meio aquoso, biodistribuição limitada, e também não possuem seletividade de acúmulo aos alvos biológicos de interesse, com isso a sua combinação com a nanotecnologia farmacêutica tem se mostrado bastante vantajosa e necessária. A combinação desses corantes aos nanomateriais, podem induzir, melhorar ou potencializar as propriedades terapêuticas desses compostos, buscando sua utilização na área da saúde (BIRHANU et al., 2017; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Além disso o nanomaterial pode alterar suas propriedades químicas e físicas, resultando em um aumento da sua solubilidade, ganhos nas taxas de permeação e absorção pelos tecidos biológicos, resistência à oxidação e volatilização, e principalmente redução de possíveis efeitos tóxicos (LI et al., 2017b).

A nanotecnologia se consolidou como uma mudança revolucionária já de âmbito industrial, trazendo uma nova compreensão e perspectivas para o campo das ciências da vida, mudando as formas de diagnósticos e tratamento de doenças, produção de alimentos e biomateriais com aplicação farmacêutica (HOLBAN, 2018).

Existe uma grande variedade de tipos de nanomaterias, podendo destacar as nanopartículas poliméricas (nanoesferas e nanocápsulas), nanopartículas lipídicas sólidas, sistemas lipídicos nanoestruturados, lipossomas, micelas poliméricas e dendrímeros. Dentre estes as nanoemulsões (NE) e nanocápsulas (NC) ganham muito destaque, devido a características únicas que estas classes de nanomateriais possuem, conferindo assim vantagens obtidas por suas propriedades físicas e químicas avançadas, as quais lhe conferem estabilidade físico-química ampliada, biocompatibilidade, e modulação da liberação de ativos de forma controlada e sustentada em função do tempo (CHATTERJEE; FONG; FUKUHARA, 2008; HAMIDI; AZADI; RAFIEI, 2008; KIRILOV et al., 2008; KONAN; GURNY; ALLEMANN, 2002).

Neste contexto este trabalho teve o objetivo de desenvolver e caracterizar nanoestruturas poliméricas, contendo um novo derivado de antraquinona obtivo via bioprocessos, afim de um novo fotossensibilizador nanoestruturado para aplicação em terapia fotodinâmica, bem com fornecer subsídios para outras aplicações como corante biotecnológico nanoestruturado.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOPROCESSOS

A terapia fotodinâmica (TFD) é um método terapêutico que pode ser utilizada para o tratamento de diversas doenças, seja como terapia única ou complementar aos protocolos terapêuticos convencionais. Essa terapia possui bastante aceitação pelos pacientes por ser menos invasiva que as terapias convencionais, além de possuir poucos efeitos colaterais e redução de dor. Além disso devido a sua simplicidade, permite a aplicação em ambiente ambulatorial, não havendo necessidade de cirurgias, e tem sido bastante utilizada e com muito sucesso nas áreas oncológica, dermatológica, ginecológica e odontológica (LUO et al.,2017; LI et al., 2017a).

O mecanismo simplificado de ação da TFD baseia-se na produção de oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$) e espécies reativas de oxigênio (EROS), partindo-se da administração de um composto denominado fotossensibilizador (FS) que poder ser por aplicação local ou sistêmica, e em seguida se faz a irradiação usando um laser de comprimento de onda específico, desencadeando uma série de reações fotoquímicas que levam à produção de oxigênio singlete e espécies reativas de oxigênio que levam à destruição do tecido alvo pela combinação de mecanismos apoptóticos e/ou necróticos (ALLISON e MOGHISSI, 2013).

2.1.1. MECANISMOS DA TFD E FOTOPROCESSOS

O mecanismo molecular da TFD é baseado na combinação correta de três componentes; fotossensibilizador (FS), luz em um comprimento de onda específico (λ) e oxigênio dissolvido no meio biológico (O_2), os quais não apresentam toxicidade quando separados, mas ao serem combinados causam o efeito terapêutico de morte dos tecidos alvos. Neste contexto, existem dois mecanismos propostos para a TFD, para se chegar a resposta desejada, sendo esses mecanismos denominados Tipo I e II, sendo que o primeiro estágio de ambos é muito semelhante (BANERJEE et al., 2017).

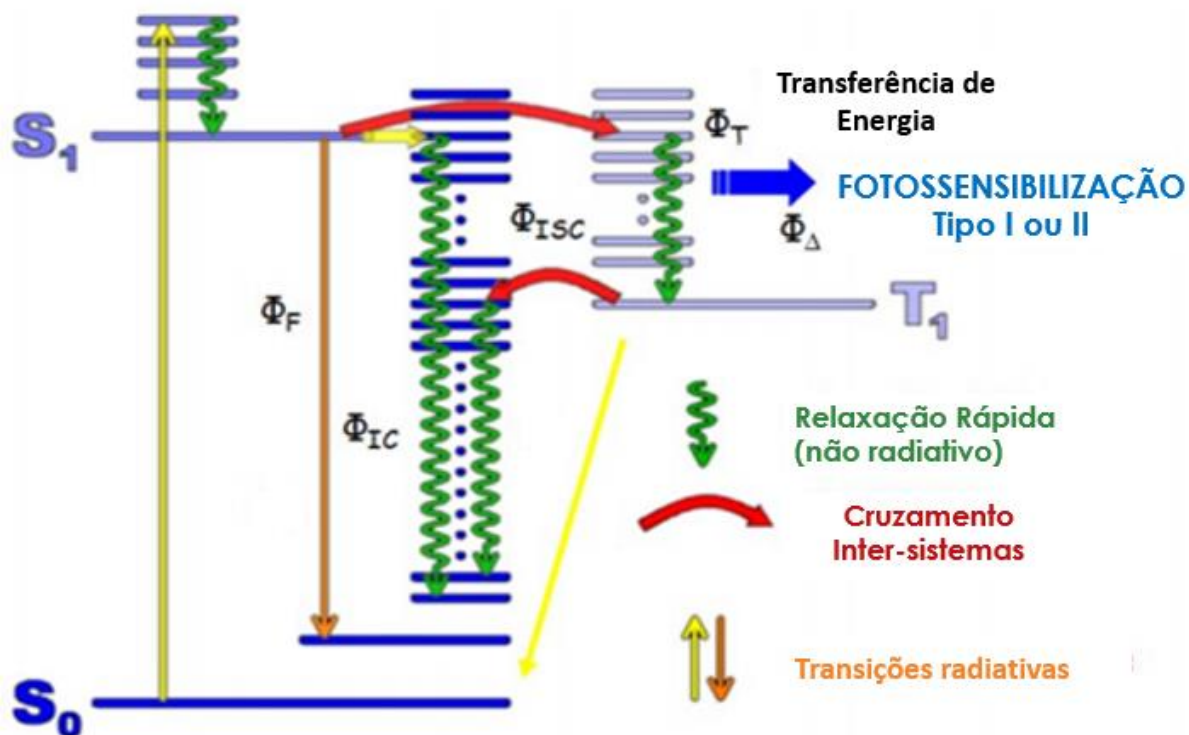
Após internalização celular do FS, inicia-se o processo de irradiação com laser em comprimento de onda na região onde o FS absorve maior energia, com isso o FS sai do seu estado fundamental (S^0) de menor energia e passa a popular os estados singletos ($S^1 - S^n$) de maior energia, então essa parte dessa energia pode ser utilizada para retornar ao estado S^0 via processo de relaxação física conhecido como conversão interna ou através de processos radiativos, como o de emissão de fluorescência (Figura 1). No entanto parte da energia pode ser transferida pelo mecanismo de conversão inter-sistema, onde o FS passa dos estados

excitados S^1/S^n e ocupa o estado tripleto excitado tripleto (T^1) de menor energia que também pode retornar diretamente ao S^0 pelo processo de conversão interna ou através do processo radiativo de emissão de fosforescência, ou desencadear uma série de interações fotoquímicas que dão origem a dois mecanismos fotodinâmicos conhecidos (Tipo I e II) (FOOTE,1991; KWIATKOWSKI et al 2018).

No mecanismo do Tipo I o FS encontra-se no estado T^1 e pode ocorrer uma transferência de energia para biomoléculas que estejam próximas levando a formação de radicais livres ou íons radicais, por sua vez essas espécies reduzidas podem transferir elétrons para o oxigênio molecular difundido no meio (que se encontra no seu estado tripleto), o que leva a geração de espécies reativas de oxigênio (EROS), peróxidos de hidrogênio, ânion superóxidos (Figura 1). No mecanismo do Tipo II o FS no estado T^1 pode transferir energia diretamente para o oxigênio molecular. Isso é possível devido ao fato do oxigênio molecular também se encontrar na conformação T^1 no seu estado fundamental, com isso é formada a espécie reativa no estado singleto, que possui propriedades oxidantes fortes (Figura 1). Em ambos os mecanismos são iniciadas uma série de reações cujos produtos, causam diferentes efeitos e respostas biológicas, como estresse oxidativo ao tecido patológico, e dano celular seguido de morte (FOOTE,1991; TEDESCO; PRIMO; DE JESUS, 2017).

As porfirinas são as moléculas de FS mais estudadas quanto a sua eficácia na TFD, algumas delas já se encontram em estudos clínicos tais como Fotofrin e Fotosan (GAO et al., 2016; ZHANG et al., 2018; LIN et al., 2018; KALETA-RICHTER et al., 2019) No entanto, há também um grande interesse em estudar as propriedades que contribuem para a atividade fotodinâmica das antraquinonas. Sua capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio após a irradiação faz com que essa molécula desperte muito interesse na área de TFD (DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2016; BANERJEE et al., 2017; DIMMER, 2017).

Figura 1 - Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos da TFD e fotoprocessos. Φ_F : rendimento quântico de fluorescência; Φ_T : rendimento quântico de tripleto; Φ_{ISC} : rendimento quântico de cruzamento inter-sistemas; Φ_{IC} : rendimento quântico de conversão interna; Φ_{Δ} : rendimento quântico de oxigênio singlete; S_0 : estado singlete fundamental; S_1 : estado singlete excitado.

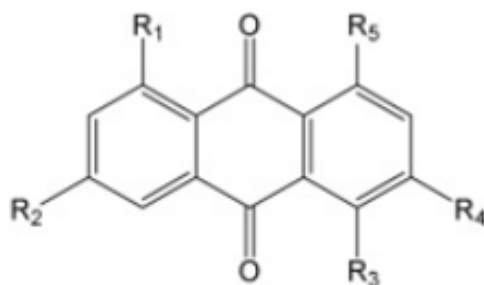


Fonte: adaptado PRIMO, 2009.

2.2. ANTRAQUINONAS

As antraquinonas (Figura 2) são o maior grupo de derivados de quinonas. As antraquinonas também constituem o maior grupo de corantes naturais com cerca de 700 compostos descritos, sendo que 200 destes compostos são obtidos a partir de plantas com flores, enquanto os demais são produzidos por líquenes e fungos (DUVAL et al., 2016). As antraquinonas naturais se diferenciam devido sua variedade de estruturas e de formas de obtenção, podendo ser extraídas de todas as partes das plantas, tais como folhas, flores, raiz, rizoma e frutos, e também podem ser obtidas de fungos e líquenes simbióticos ao vegetal (GHOSH; JOSE; KAUSHIK, 2016).

Figura 2 - Estrutura química das antraquinonas



Fonte: DUVAL et al., 2016.

Estes compostos chamam muita atenção devido a sua vasta aplicação e diversidades de propriedades tais como, atividade biológica, toxicidade reduzida, potencial antioxidante, entre outras (DUVAL et al, 2016). Esta classe de moléculas é bastante conhecida também por suas propriedades farmacológicas, possuindo atividade laxativa, entretanto estudos recentes demonstram outras atividades biológicas tais como: hepatoprotetora, anticancerígena, antiviral, antifúngica (SINGH, 2014); antimicrobiana, antioxidante (MALIK e MÜLLER, 2016) e anti-diabética (LEE e SOHN, 2008). Com essa vasta quantidade de atividades biológicas, o interesse pelo desenvolvimento de novos derivados de antraquinona vem crescendo nos últimos anos (MALIK e MÜLLER, 2016). As atividades biológicas das antraquinonas mencionadas possuem grande dependência da luz, com isso estudos relacionando as antraquinonas e TFD se tornam significativos (RAJENDRAN, 2016).

Na Tabela 1 temos algumas antraquinonas que têm sido utilizadas na prática clínica, disponibilizadas como medicamento.

Tabela 1 - Antraquinonas Comercializadas

Nome	Indicação	Nome comercial	Fontes de obtenção	Rota de administração
Daunorrubicina	Antineoplásico	Cerubidina, DaunoXome (EUA, forma lipossomal), daunoblastina®	Natural (bactérias, por exemplo, <i>Streptomyces</i> sp.) Biossíntese combinatória (engenharia genética, deformação melhoria)	Intravenoso
Doxorrubicina	Antineoplásico	Adriablastina®, Myocet ® (não peguilada lipossomal), (EUA, lipossômica peguilada), Doxil® (EUA, lipossômica peguilada)	Natural (bactérias, por exemplo, <i>Streptomyces</i> sp.) Biossíntese combinatória (engenharia genética, deformação melhoria)	Intravenoso
Valrubicina	Antineoplásico	Valstar®, Valtaxin®	Semissintética	Instilação intravesical na bexiga
Mitoxantrona	Antineoplásico, Esclerose múltipla	Novantrone®, Ralenova®	Sintética	Intravenoso
Pixantrone	Antineoplásico	Pixuvri®	Sintética	Intravenoso

Fonte: adaptado de MALIK e MÜLLER 2016

As antraquinonas possuem potencial para utilização em protocolos que utilizam terapia fotodinâmica, sua estrutura é formada por anéis aromáticos, que possuem capacidade de absorção de luz e subsequente produção de oxigênio singleto e espécies reativas de oxigênio (MONTROYA et al., 2005). Uma das desvantagens que inviabiliza o uso das antraquinonas para fins terapêuticos é a baixa solubilidade em meio aquoso, o que leva a uma falta de seletividade e entrega inespecífica em tecidos alvos, com isso a nanoencapsulação se torna uma ferramenta bastante vantajosa (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; LI et al., 2017b; BIRHANU et al., 2017).

Embora as propriedades fotoquímicas das antraquinonas sejam bem definidas, poucos estudos são encontrados usando as antraquinonas combinadas a nanotecnologia para aplicação na TFD. Com isso se torna muito interessante o estudo de fotoatividade das antraquinonas para o desenvolvimento de novos fármacos para aplicação na TFD (DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2016).

A nanoencapsulação de corantes ou pigmentos naturais tem como objetivo obter algumas vantagens tais como, diminuir uma possível toxicidade do ativo, aumento da estabilidade, redução da fotodegradação, além de promover a solubilidade em meios biológicos, biocompatibilidade, biodistribuição adequada e seletividade para tecidos alvos, considerando que nanomateriais possuem um tamanho reduzido, o que resulta em um aumento considerável na área superficial, e por consequência, promoção de algumas vantagens, como um aumento na sua eficiência de coloração e também potencializar os efeitos terapêuticos no ativo (ASSUNÇÃO et al., 2014; BIRHANU et al., 2017).

A doxorrubicina pertencente a classe das antraquinonas é um neoplásico bastante conhecido e muito utilizado. No entanto o tratamento com este composto acarreta sérios efeitos colaterais para o paciente devido à falta de seletividade pelos tecidos neoplásicos, sendo assim, muitos estudos têm sido realizados para melhorar a ação da doxorrubicina e diminuir seus efeitos colaterais (KAYANI; FIRUZI; BORDBAR, 2018). Desta forma, uma das propostas promissoras é o uso de nanocarreadores poliméricos para encapsulação e liberação controlada da doxorrubicina buscando atividade antitumoral (GOYAL et al., 2017, HAN et al., 2018). Outro composto de interesse a se destacar é o fitoterápico Ruibarbo, que possui como princípio ativo a mistura de derivados de antraquinona, e agrega muitas propriedades terapêuticas tais como, atividade antibacteriana, antifúngicas, antivirais, antioxidantes, neuroprotetora, anticâncer, laxante, hepatoprotetora, anti-angiogênica, atividades anti-inflamatórias, o que justifica o desenvolvimento de estratégias de encapsulação para melhorar suas propriedades bioativas (LI et al., 2017b). A Emodina, uma das principais antraquinonas bioativas, mostrou

propriedades laxativas leves, sendo que estudos mostraram que a Emodina reduziu significativamente o peso dos ratos em ensaios *in vivo*. No entanto um dos obstáculos foi a baixa biodisponibilidade da mesma em modelo animal, com isso o uso de nanossistemas pode ser uma estratégia adequada para contornar este obstáculo (SHI et al., 2015).

A encapsulação de muitos outros derivados de antraquinonas é alvo de estudos, e quase sempre com o mesmo propósito: melhorar sua biodisponibilidade, sua solubilidade e diminuir possíveis efeitos citotóxicos (JEEVITHA; AMARNATH, 2013; UNSAL; AYDOGAN, 2013; DE SOUZA OLIVEIRA et al., 2016; LI et al., 2017b; KAYANI; FIRUZI; BORDBAR, 2018).

2.3. NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS NANOCARREADORES

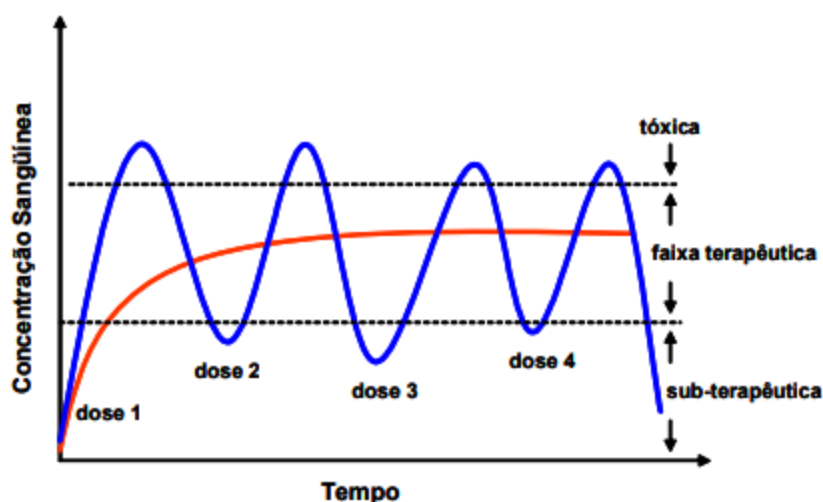
Os princípios da nanotecnologia são fundamentados no desenvolvimento de novos materiais em escalas nanométricas (escala de 10^{-9} m, a que se refere a uma fração bilionésima da unidade metro). Os materiais nanoestruturados possuem potencial diferenciado frente a outros materiais em escala de micro e/ou macroscópica, podendo ter propriedades físico-químicas, ópticas e magnéticas potencializadas, resultando em características e propriedades únicas e diferentes das observadas em outras escalas de tamanho superior (GUTIÉRREZ et al., 2017).

O emprego de sistemas nanoestruturados para incorporação de princípios ativos e fármacos proporciona certas vantagens, comparando-se aos sistemas de liberação convencionais, tendo como principais diferenças: a biocompatibilidade, o transporte eficiente do fármaco, a liberação controlada e redução de efeitos adversos inerentes ao fármaco, ampliação das formas de administração, destacando-se as vias oral, ocular, nasal, transdérmica, subcutânea, intraperitoneal e intramuscular, e além da possibilidade de administração direta na circulação sanguínea sem risco de bloqueio dos vasos ou de efeito tromboembólico (BIRHANU, 2017).

Nas formas de administração convencionais (aplicação intravenosa, oral, micropartículas, etc.) leva-se ao aumento da concentração plasmática do fármaco, até atingir um pico máximo, podendo ultrapassar os limites aceitáveis, atingindo-se níveis tóxicos e, posteriormente, resultando em um declínio repentino para concentrações inferiores à faixa terapêutica. Devido ao fato dos níveis plasmáticos do fármaco serem dependentes das doses administradas, esse processo pode ser problemático se a concentração inicial estiver próxima a tóxica, ou próxima a faixa onde ela é ineficaz (PRIMO, 2009; KESHARWANI et al., 2018).

Neste contexto, um dos principais objetivos dos sistemas nanoestruturados para liberação de fármacos, é o de manter constante a concentração plasmática do fármaco, partindo-se de uma dosagem fixa, diminuindo assim a oscilação da concentração plasmática ocasionada pelas administrações convencionais (Figura 3) (PRIMO, 2009; KOHRS et al., 2018).

Figura 3 – Perfil de liberação dos fármacos: convencional x controlada (—) liberação sustentada, (—) terapia convencional.

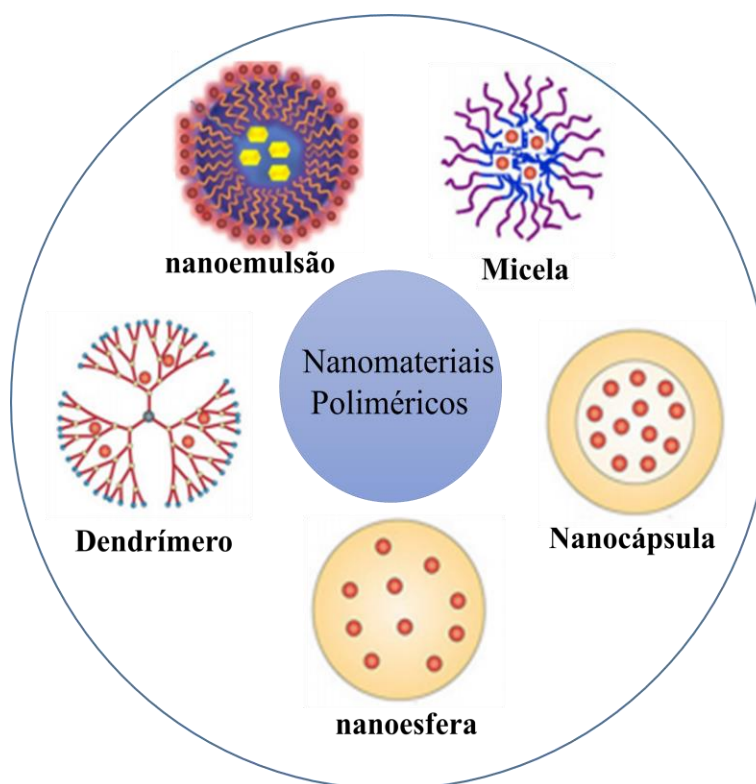


Fonte: Adaptado de PRIMO, 2009.

A nanoencapsulação de corantes ou pigmentos naturais pode resultar na melhoria das características devido ao seu tamanho reduzido, e aumento da área superficial, influenciando diretamente na eficiência de coloração e/ou atividade biológica. Destacam-se também efeitos pronunciados de diminuição da toxicidade, promoção do aumento de estabilidade, redução de fotodegradação, biocompatibilidade (ASSUNÇÃO et al., 2014).

Os nanocarreadores poliméricos (Figura 4) se destacam dentre os diferentes tipos de nanomateriais, pois possuem estabilidade físico-química ampliada, tamanho submicrômico, resistência mecânica, porosidade, possibilidade de modulação da carga superficial e funcionalização de superfície, podendo assim atender as necessidades de diversas aplicações, além de que podem ser obtidos por diversos processos, tais como emulsificação espontânea e deposição polimérica interfacial, pela combinação de copolímeros e diferentes óleos, merecendo destaque as nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsão, micelas poliméricas e dendrímeros (TANG et al., 2016, VENDITTI et al., 2017).

Figura 4 -Principais materiais nanoestruturados poliméricos utilizados para aplicação biológica.



Fonte: Adaptado ALCALÁ-ALCALÁ e QUINTANAR-GUERRERO 2014; TANG, et al., 2016.

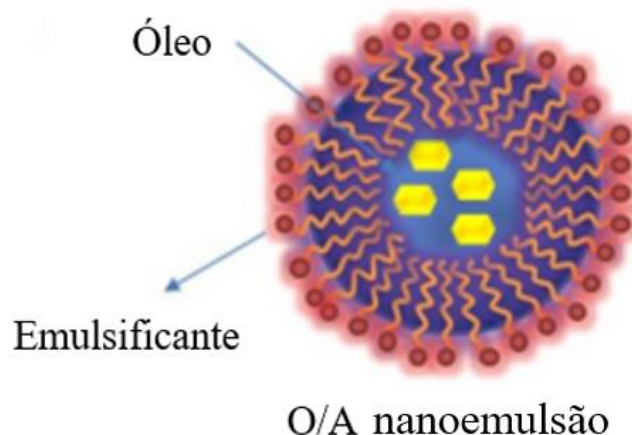
Dentre esses nanocarreadores poliméricos, destacamos as nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas, que serão melhor apresentadas nas seções seguintes.

2.3.1. NANOEMULSÕES

As nanoemulsões (NE) (Figura 5), ou também denominadas emulsões submicrônicas, são sistemas coloidais estáveis, formados por dois ou mais líquidos imiscíveis, onde um é denominado fase dispersa e o outro dispersante (KUMAR; DIVYA, 2015; PENGON et al., 2018). As NE podem ser classificadas em três principais tipos, água em óleo, óleo em água ou sistemas múltiplos (PRIMO, 2009; KUMAR; DIVYA, 2015; LEI, et al., 2018). Um processo de emulsificação necessita de energia para que se inicie e ocorra completamente, essa energia pode ser fornecida pelos métodos robustos (alta energia), no qual pode ser usado dispositivos mecânicos como os homogeneizadores de alta pressão, ultrassônicos; ou também pelos métodos de baixa energia que utilizam componentes químicos para o fornecimento de energia para que

o processo ocorra, como por exemplo os métodos por inversão de fase ou emulsificação sob ação de catalise (COSTA, et al., 2012; DONSI; FERRARI, 2016; KUMAR; MANDAL, 2018).

Figura 5 - Esquema ilustrativo da nanoemulsão do tipo óleo em água.



Fonte: Adaptada de KUMAR e DIVYA, 2015.

Estes sistemas coloidais são emulsificados em condições especiais e bem controladas de temperatura e pressão, sendo amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, fármacos e, principalmente de cosméticos (McCLEMENTS, 2012). As NE do tipo óleo em água, possuem características vantajosas como proteção e liberação de componentes de baixa solubilidade, como fármacos e compostos ativos lipofílicos de alto grau. Estes bioativos são incorporados pela matriz núcleo/oleosa, interagindo diretamente com o ambiente químico favorável durante o processo de emulsificação e ampliação da interação interfacial do sistema bifásico da mistura (MUNGURE, 2018).

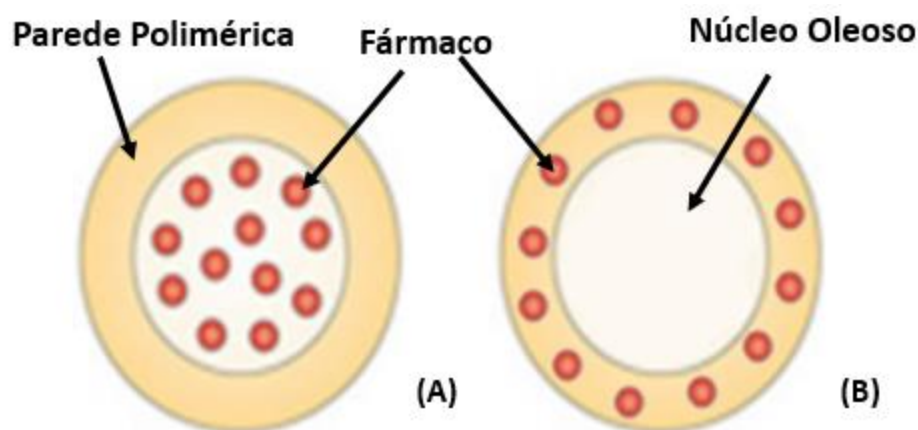
As NE promovem o aumento da biodisponibilidade dos ativos incorporados em sua matriz coloidal, resultando na alteração da digestão e metabolismo desses ativos pelas presenças dos lipídios que compõe o carreador, além de também influenciar no aumento do tempo de armazenamento dessas formulações, visto que protegem de fenômenos físico-químicos degradantes tais como a volatilização e oxidação, que comumente levam a instabilidade do medicamento e redução do seu prazo de validade (THAKKAR, et al., 2015; THOMAS et al., 2017).

2.3.2. NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

As nanocápsulas poliméricas (NC) são constituídas por um núcleo que pode ser aquoso ou oleoso e uma membrana externa polimérica (parede polimérica) (Figura 6). (OLIVEIRA et

al., 2017; CRUCHO; BARROS, 2017). As NC possuem diversas vantagens, por exemplo, os polímeros utilizados em seu preparo possuem menor custo que fosfolipídios presentes na composição dos lipossomas, além de a quantidade de polímeros ser menor em comparação com as nanoesferas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Além disso as NC possuem alta eficiência de encapsulamento, ou seja, maior capacidade de armazenamento de ativos, podendo estar localizado na superfície ou no núcleo das NC, além de possuírem maior estabilidade em temperatura ambiente, com isso as NC atribuem um maior tempo de armazenamento (tempo de prateleira) dos ativos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; CRUCHO; BARROS, 2017).

Figura 6 - Esquema de nanocápsulas poliméricas: (a) fármaco dissolvido no núcleo oleoso das nanocápsulas; b) fármaco adsorvido à parede polimérica das nanocápsulas.



Nanocápsulas

Fonte: Adaptado de ALCALÁ-ALCALÁ e QUINTANAR-GUERRERO, 2014.

Na literatura são descritas as três principais metodologias farmacêuticas para preparo de NC (RAO; GECKELER, 2011) as quais são: I) polimerização *in situ* de monômeros dispersos (FALLOUH et al., 1986) II) deposição interfacial de polímero pré-formado ou deslocamento de solvente (FESSI et al., 1989) III) e técnica de emulsificação-difusão (QUINTANAR-GUERRERO et al., 1998).

O método de deposição interfacial do polímero pré-formado é o mais simples dentre os três métodos, o qual é composto por uma fase orgânica, que é constituída de um solvente ou uma mistura de solventes solúveis em água e de um polímero que pode ser de origem natural, semissintético ou sintético. (FESSI et al., 1989; DOS SANTOS et al., 2016).

O método tem como base a dispersão de um polímero biodegradável, como por exemplo, o poliácido glicólico (PGA), policaprolactona (PCL), poliácido láctico (PLA), ou seu copolímero poli-láctico-*co*-glicólico (PLGA), natural ou sintético, de forma a obter um produto de tamanho inferior a 500 nm (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; TANG et al., 2016). Além destes componentes, necessita-se de tensoativo, substâncias lipofílicas e os ativos que se deseja encapsular. O polímero e o ativo são previamente dissolvidos na fase orgânica, vertidos sobre a fase aquosa, contendo o tensoativo. As nanopartículas se formam por difusão do solvente, deposição do polímero nas gotículas e posterior eliminação do solvente sob pressão reduzida. A mistura da fase orgânica na aquosa resulta na emulsificação espontânea, formando gotículas com recobrimento polimérico. Isso acontece devido à instabilidade da interface óleo/água causada pela rápida difusão do solvente orgânico na fase aquosa, diminuindo de forma intensa a tensão interfacial. (DERAKHSHANDEH; ERFAN; DADASHZADEH, 2007; FESSI et al., 1989; MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010).

3. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos podemos concluir que foi possível desenvolver uma formulação polimérica, contendo CV e CIAIPc individualizados ou associados utilizando-se como nanoestrutura carreadora as NC, as quais apresentaram tamanho de partícula submicrônico $< 250\text{nm}$, $\text{PDI} < 0,3$ e carga residual predominantemente negativa, além disso se mantiveram estáveis durante o período de acompanhamento de 3 meses quando armazenada a $7\text{ }^\circ\text{C}$; a estabilidade acelerada também mostrou uma estabilidade de 3 meses para Vazia/NC e CV/CIAIPc/NC e de 5 meses para CV/NC e CIAIPc/NC quando armazenadas a $25\text{ }^\circ\text{C}$. As análises de MFA realizadas para CV/NC e CV_CIAIPc/NC, mostram uma morfologia esférica para ambas as NC e tamanho de partícula de 104 nm para CV/NC e 211nm para CV_CIAIPc/NC, as análises por diferença de fase mostraram que a superfície da partícula é homogênea ou seja composta somente pelo PLGA e também é possível afirmar que não há presença de ativo livre no meio das NC. Os estudos espectroscópicos mostram que não há alteração das características fotofísicas dos ativos (CV e CIAIPc) em relação a sua forma livre, encapsulados de forma individual ou quando associados. A linearidade foi realizada com sucesso, obtendo um coeficiente de correlação apropriado, na ordem de $0,999$ o que é satisfatório, e a partir da curva foi possível obter a concentração real do composto associado ao sistema de nanocarreador pelo método espectroanalítico. A quantificação das NC apresentou uma taxa de incorporação de 70% para CV/NC, 63% para CIAIPc/NC, para CV_CIAIPc/NC a taxa foi de 60% para CV e 63% para CIAIPc. A análise de eficiência de encapsulação do ativo foi de 100% para todas as NC, isso também pode ser comprovado pelas análises de diferença de fase da MFA. Os estudos de tempo de vida de fluorescência mostram tempos de vida curtos para as amostras CV/DMSO_ACN, CV/NC, CV/CIAIPc/NC e CIAIPc/NC, o que pode indicar que o composto CV pode possuir rendimentos elevados de transferência de energia para processos não radiativos, supondo um possível potencial fotodinâmico, o qual será explorado nos ensaios futuros. Os ensaios de viabilidade celular, mostraram ausência de citotoxicidade para todas as NC apresentando viabilidade celular maior que 98% , o que mostra que as NC são biocompatíveis, além disso o CV livre também não apresentou citotoxicidade para células saudáveis, apresentando uma viabilidade celular maior que 93% . Esses resultados permitem que seja feito o delineamento dos estudos futuros baseados em testes fotobiológicos em cultura celular buscando o direcionamento e aplicabilidade biológica e/ou biomédica da formulação nanoestruturada em protocolos de Terapia Fotodinâmica e em Fotoprocessos.

REFERÊNCIAS

- AHMED, O. M.; MOHAMED, T.; MOUSTAFA, H.; HAMDY, H.; AHMED, R. R.; ABOUD, E. Quercetin and low level laser therapy promote wound healing process in diabetic rats via structural reorganization and modulatory effects on inflammation and oxidative stress. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 58-73, 2018.
- ALCALÁ-ALCALÁ, S.; QUINTANAR-GUERRERO, D. La terapia a nanoescala: ensamblaje de estructuras liberadoras de fármacos. **Mundo Nano. Revista Interdisciplinaria en Nanociencia y Nanotecnología**, v. 7, n. 12, 2014.
- ALLISON, R R.; MOGHISSI, K. Photodynamic therapy (PDT): PDT mechanisms. **Clinical Endoscopy**, v. 46, n. 1, p. 24, 2013.
- ASSUNÇÃO, L.; FERREIRA, C.; DE CONCEIÇÃO, E. J. L.; NUNES, I. Estudo prospectivo sobre encapsulamento de compostos bioativos. **Revista GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 4, p. 1382-1391, 2014.
- BANERJEE, S. M.; MACROBERT, A. J.; MOSSE, C. A.; PERIERA, B.; BOWN, S. G.; KESHTGAR, M. R. S. Photodynamic therapy: Inception to application in breast cancer. **The Breast**, v. 31, p. 105-113, 2017.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential—What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.
- BIRHANU, G.; JAVAR, H. A.; SEYEDJAFARI, E.; ZANDI-KARIMI, A. Nanotechnology for delivery of gemcitabine to treat pancreatic cancer. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 88, p. 635-643, 2017.
- BOLEAN, M., BORIN, I. A., SIMÃO, A. M., BOTTINI, M., BAGATOLLI, L. A., HOYLAERTS, M. F.; MILLÁN, J. L.; CIANCAGLINI, P. Topographic analysis by atomic force microscopy of proteoliposomes matrix vesicle mimetics harboring TNAP and AnxA5. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1859, n. 10, p. 1911-1920, 2017.
- CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 160, p. 240-247, 2016.
- CHATTERJEE, D. K.; FONG, L. S.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 1627-1637, 2008.
- COSTA, J. A.; LUCAS, E. F.; QUEIRÓS, Y. G.; MANSUR, C. R. Evaluation of nanoemulsions in the cleaning of polymeric resins. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 415, p. 112-118, 2012.
- CRUCHO, C. I.; BARROS, M. T. Polymeric nanoparticles: A study on the preparation variables and characterization methods. **Materials Science and Engineering: C**, v. 80, p. 771-784, 2017.
- DE SOUZA OLIVEIRA, R. C.; CORRÊA, R. J.; TEIXEIRA, R. S. P.; QUEIROZ, D. D.; DA SILVA SOUZA, R.; JARDIM, S. J.; DE LUCAS, N. C.; PEREIRA M. D.; BELLO FORERO, J. S.; ROMANI, E. C.; RIBEIRO, E. S. Silica nanoparticles doped with anthraquinone for lung cancer phototherapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 165, p. 1-9, 2016.

DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 1, p. 34-41, 2007.

DIMMER, J. A.; MONTOYA, S. C. N.; MENDOZA, C. S.; CABRERA, J. L. Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 137, p. 94-100, 2017.

DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.

DOS SANTOS, P. P.; FLORES, S. H.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; CHISTE, R. C. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 23-33, 2016.

DUVAL, J.; PECHER, V.; POUJOL, M.; LESELLIER, E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 812-833, 2016.

FALLOUH, N. A. K.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 28, n. 2-3, p. 125-132, 1986.

FESSI, H. P. F. D.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.

FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659-659, 1991.

FRESHNEY, R. I. The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd. ed. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 71.

GAO, Shegan et al. Specific cellular accumulation of photofrin-II in EC cells promotes photodynamic treatment efficacy in esophageal cancer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 14, p. 27-33, 2016.

GHOSH, A.; JOSE, D.; KAUSHIK, R. Anthraquinones as versatile colorimetric reagent for anions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 545-560, 2016.

GHOSH, A.; KAREDLA, N.; THIELE, J. C.; GREGOR, I.; ENDERLEIN, J. Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy: Basics and Applications. **Methods**, v. 140, p. 32-39, 2018.

GOYAL, G.; HWANG, J.; AVIRAL, J.; SEO, Y.; JO, Y.; SON, J.; CHOI, J. Green synthesis of silver nanoparticles using β -glucan, and their incorporation into doxorubicin-loaded water-in-oil nanoemulsions for antitumor and antibacterial applications. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 179-186, 2017.

GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G.; O'DONOVAN, A.; LOHANI, M. (Ed.). **Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2015.

GUTIÉRREZ, L.; STEPIEN, G.; GUTIÉRREZ, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; PARDO, J.; PARDO, J.; GRAZU, V.; DE LA FUENTE, J. M. Nanotechnology in Drug Discovery and

Development. In: CHACKALAMANNIL, S.; ROTELLA, D.; SIMON WARD, S. (Ed.). **Comprehensive Medicinal Chemistry III**. 3rd. ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2017. P. 264–295.

HAMIDI, M.; AZADI, A.; RAFIEI, P.. Hydrogel nanoparticles in drug delivery. **Advanced drug delivery reviews**, v. 60, n. 15, p. 1638-1649, 2008.

HAN, N. N.; LI, X.; TAO, L.; ZHOU, Q. Doxorubicin and rhein loaded nanomicelles attenuates multidrug resistance in human ovarian cancer. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 498, n. 1, p. 178-185, 2018.

HOLBAN, A. M. Series Preface: Pharmaceutical Nanotechnology. In: **Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs**. p. 21- 22. 2018.

JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 153, p. 178-183, 2016.

JAYME, C. C.; DE PAULA, L. B.; REZENDE, N.; CALORI, I. R.; FRANCHI, L. P.; TEDESCO, A. C. DNA polymeric films as a support for cell growth as a new material for regenerative medicine: Compatibility and applicability. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 404-412, 2017.

JEEVITHA, D.; AMARNATH, K. Chitosan/PLA nanoparticles as a novel carrier for the delivery of anthraquinone: Synthesis, characterization and in vitro cytotoxicity evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 101, p. 126-134, 2013.

JIN, Y.; ZHANG, X.; ZHANG, B.; KANG, H.; DU, L.; LI, M. Nanostructures of an amphiphilic zinc phthalocyanine polymer conjugate for photodynamic therapy of psoriasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 128, p. 405-409, 2015.

KALETA-RICHTER, M.; KAWCZYK-KRUPKA, A.; AEBISHER, D.; BARTUSIK-AEBISHER, D.; CZUBA, Z.; CIEŚLAR G. The capability and potential of new forms of personalized colon cancer treatment: Immunotherapy and Photodynamic Therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v.25, p 253-258, 2019.

KAYANI, Z.; FIRUZI, O.; BORDBAR, A-K. Doughnut-shaped bovine serum albumin nanoparticles loaded with doxorubicin for overcoming multidrug-resistant in cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1835-1843, 2018.

KESHARWANI, P.; GORAIN, B.; LOW, S. Y.; TAN, S. A.; LING, E. C. S.; LIM, Y. K.; CHIN, C. M.; LEE, P. Y.; LEE, C.M.; OOI, C.H.; CHOUDHURY, H.; CHOUDHURY, H. Nanotechnology based approaches for anti-diabetic drugs delivery. **Diabetes Research and Clinical Practice**, v. 136, p. 52-77, 2018.

KIRILOV, P.; LUKYANOVA, L.; FRANCESCHI-MESSANT, S.; PERIER, V.; PEREZ, E.; RICO-LATTES, I. A new type of colloidal dispersions based on nanoparticles of gelled oil. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 328, n. 1-3, p. 1-7, 2008.

KOHR, N.J.; LIYANAGE, T.; VENKATESAN, N.; NAJARZADEH, A.; PULEO. Drug Delivery Systems and Controlled Release. **Reference Module in Biomedical Sciences**, Elsevier, 2018.

KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLÉMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 66, n. 2, p. 89-106, 2002.

KUMAR, G. P.; DIVYA, A. Nanoemulsion based targeting in cancer therapeutics. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p. 272-284, 2015.

KUMAR, N.; MANDAL, A. Oil-in-water nanoemulsion stabilized by polymeric surfactant: Characterization and properties evaluation for enhanced oil recovery. **European Polymer Journal**, v. 109, p. 265-276, 2018.

KWIATKOWSKI, S.; KNAP, B.; PRZYSTUPSKI, D.; SACZKO, J.; KEDZIERSKA, E.; KNAP-CZOP; K KOTLIŃSKAB, J.; MICHEL, O.; KOTOWSKIA, K.; KULBACKA, J. Photodynamic therapy—mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

LEE, M. S.; SOHN, C. B. Anti-diabetic properties of chrysophanol and its glucoside from rhubarb rhizome. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 11, p. 2154-2157, 2008.

LEI, K.; WANG, X.; LI, X.; WANG, L. The innovative fabrication and applications of carvacrol nanoemulsions, carboxymethyl chitosan microgels and their composite films. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 175, p. 688-696, 2018.

LERCHE, D.; SOBISCH, T. Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 440, p. 122-130, 2014.

LI, J.; SHI, Y.; REN, Y.; CONG, Z.; WU, G.; CHEN, N.; ZHAO, X.; LI, L. Development and evaluation of self-nanoemulsifying drug delivery system of rhubarb anthraquinones. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 39, p. 283-295, 2017 (b).

LI, W.; XIE, Q.; LAI, L.; MO, Z.; PENG, X.; LENG, E.; ZHANG, D.; SUN, H.; LI, Y.; MEI, W.; GAO, S. In vitro evaluation of ruthenium complexes for photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 18, p. 83-94, 2017 (a).

LIN, Y. T.; HSIAO, Y. C.; CHIANG, Y. F.; CHANG, C. J. Topical application of Photofrin® for photodynamic diagnosis of malignant cutaneous neoplasms. **Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery**, v. 71, n. 10, p. 1487-1495, 2018.

LUO, D.; CARTER, K. A.; MIRANDA, D.; LOVELL, J. F. Chemophototherapy: an emerging treatment option for solid tumors. **Advanced Science**, v. 4, n. 1, p. 1600106, 2017.

MALIK, E. M.; MÜLLER, C.E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal research reviews**, v. 36, n. 4, p. 705-748, 2016.

MARÍN, RR R.; BABICK, F.; HILLEMANN, L. Zeta potential measurements for non-spherical colloidal particles—Practical issues of characterisation of interfacial properties of nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 532, p. 516-521, 2017.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719-1729, 2012.

MONTOYA, S. C. N.; COMINI, L. R.; SARMIENTO, M.; BECERRA, C.; ALBESA, I.; ARGÜELLO, G. A.; CABRERA, J. L. Natural anthraquinones probed as Type I and Type II photosensitizers: singlet oxygen and superoxide anion production. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 78, n. 1, p. 77-83, 2005.

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

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MU, X.; WANG, L.; WANG, L.; GE, R.; DANG, H.; MOU, K. Plum-blossom needling enhanced the effect of photodynamic therapy on basal cell carcinoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 339-341, 2018.

MUNGURE, T. E.; ROOHINEJAD, S.; BEKHIT, A. E. D.; GREINER, R.; MALLIKARJUNAN, K. Potential application of pectin for the stabilization of nanoemulsions. **Current Opinion in Food Science**, v. 19, p. 72-75, 2018.

O'CONNELL, K. A.; OKHOVAT, J. P.; ZEITOUNI, N. C. Photodynamic Therapy for Bowen's Disease (Squamous Cell Carcinoma in situ) Current Review and Update. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 24, p. 109-114, 2018.

OLIVEIRA, L. T.; DE PAULA, M. A.; ROATT, B. M.; GARCIA, G. M.; SILVA, L. S. B.; REIS, A. B.; DE PAULA, C.S, VILELA, J.M.C.; ANDRADE, M.S.; LIBRA-LANA, G.; MOSQUEIRA, V. C. F. Impact of dose and surface features on plasmatic and liver concentrations of biodegradable polymeric nanocapsules. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, p. 19-32, 2017.

PENGON, S.; CHINATANGKUL, N.; LIMMATVAPIRAT, C.; LIMMATVAPIRAT, S. The effect of surfactant on the physical properties of coconut oil nanoemulsions. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 5, p. 409-414, 2018.

PRIMO, F. L. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo in vitro de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão**. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Ribeirão Preto - SP, 2009.

PRIMO, F.L.; DA COSTA REIS, M. B.; PORCIONATTO, M.A.; TEDESCO, A.C. In vitro evaluation of chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion and low-level laser therapy on human skin dermal equivalents and bone marrow mesenchymal stem cells. **Current Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 22, p. 3376-3381, 2011.

QUINTANAR-GUERRERO, D.; ALLÉMANN, E.; DOELKER, E.; FESSI, H. Preparation and characterization of nanocapsules from preformed polymers by a new process based on emulsification-diffusion technique. **Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 7, p. 1056-1062, 1998.

RAJENDRAN, M. Quinones as photosensitizer for photodynamic therapy: ROS generation, mechanism and detection methods. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 13, p. 175-187, 2016.

RAO, J. P.; GECKELER, K. E. Polymer nanoparticles: preparation techniques and size-control parameters. **Progress in Polymer Science**, v. 36, n. 7, p. 887-913, 2011.

SHAHID, M.; SHAHID-UL-ISLAM.; MOHAMMAD, F. Recent advancements in natural dye applications: a review. **Journal of Cleaner Production**, v. 53, p. 310-331, 2013.

SHI, Y.; LI, J.; REN, Y.; WANG, H.; CONG, Z.; WU, G.; DU, L.; LI, H; ZHANG, X. Pharmacokinetics and tissue distribution of emodin loaded nanoemulsion in rats. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 30, p. 242-249, 2015.

SINGH, A. **Herbal Drugs as Therapeutic Agents**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 2014.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.

SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 1, p. 9-14, 2010.

SOUISSI, M.; GUESMI, A.; MOUSSA, A. Valorization of natural dye extracted from date palm pits (*Phoenix dactylifera*) for dyeing of cotton fabric. Part 2: Optimization of dyeing process and improvement of colorfastness with biological mordants. **Journal of Cleaner Production**, v. 204, p. 1143-1153, 2018.

TANG, Z.; HE, C.; TIAN, H.; DING, J.; HSIAO, B. S.; CHU, B.; CHEN, X. Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 86-128, 2016.

TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; DE JESUS, P. da C. C. Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers. In: GRUMEZESCU, A. M. (editor). **Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017. p. 9-29.

THAKKAR, H. P.; KHUNT, A.; DHANDE, R. D.; PATEL, A. A. Formulation and evaluation of Itraconazole nanoemulsion for enhanced oral bioavailability. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 6, p. 559-569, 2015.

THOMAS, L.; ZAKIR, F.; MIRZA, M. A.; ANWER, M. K.; AHMAD, F. J.; IQBAL, Z. Development of Curcumin loaded chitosan polymer based nanoemulsion gel: In vitro, ex vivo evaluation and in vivo wound healing studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 569-579, 2017.

TREUEL, L.; BRANDHOLT, S.; MAFFRE, P.; WIEGELE, S.; SHANG, L.; NIENHAUS, G. U. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle–cell interactions. **ACS nano**, v. 8, n. 1, p. 503-513, 2014.

UNSAI, H.; AYDOGAN, N. Formation of chiral nanotubes by the novel anthraquinone containing-achiral molecule. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, p. 301-311, 2013.

VELHO, S. R.; BRUM, L. F.; PETTER, C. O.; DOS SANTOS, J. H. Z.; ŠIMUNIĆ, Š.; KAPPA, W. H. Development of structured natural dyes for use into plastics. **Dyes and Pigments**, v. 136, p. 248-254, 2017.

VENDITTI, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: a review. **Journal of King Saud University-Science**, 2017. In Press. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.10.004>> .

ZHANG, J.; JIANG, C.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; ZHANG, H.; MUEHLMANN, L. A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 137-146, 2018.

ZHOU, W.; LIU, W.; ZOU, L.; LIU, W.; LIU, C.; LIANG, R.; CHEN, J. Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 330-337, 2014.

