

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE BIOMATERIAIS E
BIOPROCESSOS
MESTRADO PROFISSIONAL

“DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PELO MÉTODO
NANO SPRAY DRYER PARA ENCAPSULAÇÃO DE CORANTES
FOTOSSENSÍVEIS”

GRACIELY GOMIDES GOBO

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO

COORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CLAUDIO TEDESCO

ARARAQUARA - SP

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

“DESENVOLVIMENTO DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS PELO MÉTODO
NANO SPRAY DRYER PARA ENCAPSULAÇÃO DE CORANTES
FOTOSENSÍVEIS”

GRACIELY GOMIDES GOBO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos (Mestrado Profissional), Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos.

ORIENTADOR: Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO
COORIENTADOR: Prof. Dr. ANTONIO CLAUDIO TEDESCO

ARARAQUARA - SP

2019

G575d

Gobo, Graciely Gomides.

Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas pelo método nano spray dryer para encapsulação de corantes fotossensíveis / Graciely Gomides Gobo. – Araraquara: [S.n.], 2019. 74 f. : il.

Dissertação (Mestrado Profissional) – Universidade Estadual Paulista. "Júlio de Mesquita Filho". Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Engenharia de Biomateriais e Bioprocessos. Área de Biomateriais, Bioprocessos, Bioprodutos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

Coorientador: Antonio Claudio Tedesco.

1. Nanopartículas. 2. Nano Spray Dryer. 3. Quinizarina. 4. Terapia fotodinâmica. 5. Tratamento de câncer. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Tedesco, Antonio Claudio, coorient. III. Título.

Diretoria do Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara

CAPES: 33004030170P0

Esta ficha não pode ser modificada

Dedicatória

Essa Dissertação é dedicada especialmente aos meus pais,
Amarildo e Maria, nunca terei palavras para agradecer
todo apoio e o amor incondicional de vocês.

Agradecimentos

Inicialmente agradeço a Deus, por me proporcionar estes aprendizados e por colocar pessoas especiais em minha vida, que de alguma forma me tornaram uma pessoa melhor.

Aos meus pais Amarildo e Maria e ao meu irmão Alexandre por todo o apoio, amor, incentivo e amparo em todas as etapas deste meu sonho, sem vocês eu não conseguiria chegar até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, agradeço pela oportunidade de desenvolver este projeto, pela orientação, dedicação, paciência e por todos ensinamentos durante estes anos de convivência e trabalho.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco, agradeço por disponibilizar o Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina da FFCL-RP-USP para que eu pudesse realizar todos os meus experimentos, gostaria de agradecer também pela orientação, confiança, dedicação, respeito e por todo aprendizado adquiridos durante estes sete anos de convivência.

Ao meu amigo Henrique Luís Piva, por todas as discussões, ideais geniais e planejamentos experimentais, que fez com que este tempo se torna-se mais leve e divertido, obrigada por toda paciência e ensinamentos.

A técnica do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina e amiga Olímpia Paschoal, obrigada por me acolher tão bem no grupo desde o primeiro momento, pelas nossas idas e vindas de Araraquara, obrigada por ser minha confidente e me ajudar tanto na vida pessoal quanto profissional.

A amiga Luandra Takahashi, por me acompanhar até altas horas no Laboratório, aos ensinamentos que de alguma forma contribuíram neste trabalho, obrigada por toda a paciência, carinho e companheirismo.

A amiga Dra. Patrícia Leme Goto, que mesmo longe participou ativamente desta fase, sempre se demonstrando atenciosa e me ajudando em decisões importantes, obrigada por tornar os meus dias mais confiantes e alegres.

Ao amigo Prof. Dr. Marigilson Siqueira Moura, pelos ensinamentos minuciosos em cultura celular quando iniciei as atividades na Nanophoton, este aprendizado foi o marco inicial no Laboratório de pesquisa e foi fundamental para finalização deste projeto.

Aos meus queridos amigos do CNET (Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual- USP-RP) Naty Nossi, Nayara Rezende, Maiko Carlos, Mary Trafani, Camila Amantino, Leo Barcelos, Diogo Pellosi, Léo Franchi, Dani Silvestrini, Barbara Gimenes, Cristiano Jayme, Carla Souza, Danieli Mônico, Hiago Salge pelos trabalhos em grupo, pela harmoniosa convivência e altos cafés que tornaram os momentos mais alegres e agradáveis.

Epígrafe

*“Ensaia um sorriso
e oferece-o a quem não teve nenhum.”*

Mahatma Gandhi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	18
2.1 OBJETIVO GERAL	18
2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	19
3.1. NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA	19
3.1.1. NANOPARTÍCULAS E O MÉTODO DE ATOMIZAÇÃO	20
3.2. CÂNCER	22
3.2.1. CÂNCER DE PELE	23
3.2.2. TERAPIA FOTODINÂMICA.....	24
3.3 CORANTES: CONCEITO, CLASSIFICAÇÃO E PRINCIPAIS APLICAÇÕES.	26
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1. MATERIAIS.....	29
4.2. PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO QUINIZARINA.....	29
4.3. MÉTODO ESPECTROANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO CORANTE POR ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS E FLUORIMETRIA.....	33
4.4. DETERMINAÇÃO DA TAXA DE INCORPORAÇÃO DO CORANTE NA NANOPARTÍCULA.....	33
4.5. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (<i>DYNAMIC LIGHT SCATTERING</i> – DLS).....	34
4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV	34
4.7. CULTURA CELULAR	35
4.7.1. EXPANSÃO E CULTURA	35
4.7.2. ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR	36
4.7.3. CITOTOXICIDADE DAS NPS EM CONDIÇÃO DE ESCURO.....	36

4.7.4.	FOTOTOXICIDADE DAS NPS EM CONDIÇÃO DE LUZ.....	37
4.7.5.	CITOMETRIA DE FLUXO (ANÁLISE DE VIA DE MORTE CELULAR)	38
4.7.6.	MICROSCOPIA CONFOCAL	38
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	39
5.1.	NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS – ESTUDO DA SÍNTESE	39
5.1.1.	ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA	40
5.2.	ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV-VISÍVEL	50
5.3.	MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV	52
5.4.	CULTURA CELULAR	54
5.4.1.	EXPANSÃO E CULTURA	54
5.4.2.	ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO.....	55
5.4.3.	CITOTOXICIDADE DAS NPS EM CONDIÇÃO DE ESCURO E FOTOTOXICIDADE DAS NPS.....	56
5.4.4.	CITOMETRIA DE FLUXO.....	59
5.4.5.	MICROSCOPIA CONFOCAL	64
6.	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	69

RESUMO

Neste trabalho de mestrado profissional foi possível obter um sistema nanoestruturado polimérico contendo Quinizarina (QZ), um corante fotossensibilizador que emerge como nova alternativa para tratamento antitumoral, utilizando a terapia fotodinâmica (TFD). As nanopartículas foram produzidas em escala, utilizando um método inovador de *Nano Spray Dryer* as quais foram caracterizadas por diferentes métodos, tais como: Espectroscopia por Absorção e Emissão de Fluorescência na região do Ultra-Violeta Visível (UV-Vis), Espalhamento de Luz dinâmica (DLS) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). Através das caracterizações observou-se nanopartículas monodispersas com diâmetro hidrodinâmico reduzido, verificou-se também que as nanopartículas foram preparadas de forma eficiente, o qual obteve-se a encapsulação das partículas QZ camada por camada (*layer by layer*). As nanopartículas foram preparadas utilizando uma rota de baixo custo e com altíssimo rendimento (>70%). Após a completa caracterização do sistema, as nanopartículas foram aplicadas em testes biológicos *in vitro* utilizando dois tipos de linhagens celulares: a fibroblástica (NIH-3T3) e cancerígena de origem melanocítica (B16-F10). Realizou-se estudos de biocompatibilidade, internalização utilizando QZ livre e encapsulada (*uptake*) e microscopia confocal em ambas as linhagens utilizadas e testes de fototoxicidade na linhagem melanocítica. Observou-se através dos estudos de *uptake* que houve uma maior internalização da quinizarina nanoestruturada, devido à sua alta biocompatibilidade, em relação a quinizarina livre. O estudo de internalização através da microscopia confocal demonstrou que o sistema nanoestruturado QZ funciona como um potente corante (fármaco fotossensibilizante), devido à sua capacidade de marcação nuclear, o que ainda não é encontrado na literatura utilizando a linhagem melanocítica. Os estudos *in vitro* foram realizados na ausência e presença de luz (LED), sendo que na ausência de luz (escuro), observou-se viabilidade compatível, não apresentando significativa morte celular, já os estudos na presença de luz o efeito fotodinâmico foi expressivo, onde houve grande morte celular. Dentro deste contexto as nanopartículas poliméricas contendo Quinizarina (QZ) é um potencial fármaco fotossensibilizante, podendo ser aplicado em terapia fotodinâmica para o câncer de pele melanômico.

Palavras-chave: Nanopartículas. *Nano Spray Dryer*. Quinizarina. Terapia fotodinâmica. Tratamento de câncer.

ABSTRACT

In this professional master's work it was possible to obtain a polymeric nanostructured system containing Quinizarin (QZ), a photosensitizing dye that appears as a new alternative for antitumor treatment, using a photodynamic therapy (PDT). The nanoparticles were produced in scale using an innovative Nano Spray Dryer method, and characterized by different methods such as: Absorption Spectroscopy and Fluorescence Emission in the Ultra-Violet and Visible Region (UV-Vis), Dynamic Light Scattering (DLS) and Scanning Electron Microscopy (SEM). Through characterizations, was observed that the nanoparticles produced were monodispersed and small hydrodynamic diameter, the particles were prepared in an efficient way, which encapsulated the QZ particles layer by layer. The nanoparticles were prepared using a low cost, high yield (> 70%) route. After a complete characterization of the system, nanoparticles were applied in *in vitro* biological tests using two types of cell line: a fibroblast (NIH-3T3) and a melanocytic cancer (B16-F10). Biocompatibility, uptake, using free and encapsulated QZ and confocal microscopy studies were performed in both cell lines, and phototoxicity tests were performed in melanocytic cell line. It was observed through uptake studies that there was a greater internalization of nanostructured quinizarin, due to its high biocompatibility, compared to free quinizarin. The internalization study by confocal microscopy demonstrates that the QZ nanostructured system functions as a potent dye (photosensitizing drug) due to its nuclear labeling capability, or that has not yet been found in the literature using a melanocytic line. *In vitro* studies were performed in the absence and presence of light (LED), and the absence of light (dark), prevented the viability of use, showed no significant cell death, while studies in the presence of light or photodynamic effect were expressive, where there was great cell death. Within this context, as polymeric nanoparticles with Quinizarin (QZ), is a potential photosensitizing drug and can be applied in photodynamic therapy for melanomic skin cancer.

Keywords: Nanoparticles. *Nano spray dryer*. Quinizarin. Photodynamic therapy. Cancer treatment.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- (A) Convergência da nanotecnologia com a biotecnologia (ROCO, 2003) e (B) Distribuição do número total de ensaios clínicos utilizando nanopartículas e lipossomas nas cinco regiões de maior contribuição do mundo (OBAID et al., 2016).....	17
Figura 2 - Estrutura dos diferentes sistemas nanocarreadores baseados na composição lipídica.	20
Figura 3 - Esquema representativo para o equipamento Nano Spray Dryer B-90 ilustrando a câmara de fluxo de gás, bem como o recipiente de secagem e o eletrodo de coleta de material nanoparticulado (WANG et al., 2016).....	22
Figura 5 - Diagrama simplificado do mecanismo fotodinâmico. (KONAN et al., 2002).....	25
Figura 6 - Exemplo de uma nanopartícula para liberação de fármaco, e ativada pela presença de luz para emissão de espécies reativas para tratamento com Terapia Fotodinâmica (OBAID et al., 2016).	26
Figura 4 – Estrutura química básica da antraquinona (A), e estrutura química simétrica da Quinizarina - QZ (B).....	27
Figura 7 - Esquema resumido representando o protocolo geral para preparo das Nanopartículas poliméricas para associação do corante Quinizarina.	32
Figura 8 - Fotos do eletrodo e coleta da amostra após a atomização pelo Nano Spray Dryer.	32
Figura 9 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.	41
Figura 10 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão (PDI) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.	42
Figura 11 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.	43
Figura 12 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanoemulsão contendo Quinizarina e CPSL em relação ao tempo.	44
Figura 13- Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanoemulsão contendo Quinizarina e CPSL em relação ao tempo.	44
Figura 14 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão contendo Quinizarina, CPSL e PMMA em relação ao tempo.....	45
Figura 15 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanopartícula Vazia (5) e contendo Quinizarina (4) em relação ao tempo.	46

Figura 16 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanopartícula Vazia (5) e contendo Quinizarina (4) em relação ao tempo.	47
Figura 17 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão Vazia (5) e contendo Quinizarina (4) em relação ao tempo.	47
Figura 18 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanopartícula Quinizarina (6) e contendo Nanopartícula Vazia (7) em relação ao tempo.	48
Figura 19 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanopartícula Quinizarina (6) e contendo Nanopartícula Vazia (6) em relação ao tempo.	49
Figura 20 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanopartícula de Quinizarina (6) e Nanoemulsão Vazia (7) em relação ao tempo.	49
Figura 21 - Espectros de absorção (A) e emissão (B) de QZ em diferentes concentrações em acetonitrila de grau espectroscópico.	51
Figura 22 - Curva padrão analítica de Quinizarina em acetonitrila (A) absorvância versus concentração ($y = 0,08072 + 0,00686x$, $R^2 = 0,99998$) e (B) intensidade de fluorescência versus concentração ($y=32593982973x+23483,1885$, $R^2 = 0,99917$).	52
Figura 23 - MEV da amostra de NP “Vazia”. Magnitude – 5,0 Kx, EHT = 20 Kv (A) e Magnitude -20 Kx, EHT= 20 Kv (B).	53
Figura 24 - MEV da amostra de NP de Quinizarina. Magnitude – 5,0 Kx, EHT = 20 Kv (A) e Magnitude -10 Kx, EHT= 20 Kv (B).	53
Figura 25 – (A) Linhagem fibroblastóide NIH-3T3 e (B) linhagem melanocítica B16-F10, ambas comerciais obtidas da ATCC.	54
Figura 26 - Espectros de emissão da Quinizarina (A) livre em DMSO, e nanoparticulada (B) em diferentes concentrações na linhagem NIH-3T3, após 3h de internalização, seguida de lavagem com PBS, obtidos em meio de cultura DMEM sem a presença do indicador vermelho de fenol.	55
Figura 27 - Espectros de emissão da QZ nanoparticulada em diferentes concentrações na linhagem B16-F10, após 3h de internalização, seguida de lavagem com PBS, obtidos em meio de cultura RPMI-1640 sem a presença do indicador vermelho de fenol.	56
Figura 28 - Ensaios de Viabilidade por MTT, da célula fibroblastóides de camundongo (NIH-3T3) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de escuro, com concentrações de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ a 286 $\mu\text{g/mL}$. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância <i>One-way</i> ANOVA seguido do pós-teste <i>Tukey t-test</i> para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).	57

Figura 29 - Ensaio de Viabilidade por MTT, da linhagem celular melanocítica (B16-F10) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de escuro, com concentrações de 28 µg/mL a 268 µg/mL.(A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância <i>One-way</i> ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (*p<0,05).....	58
Figura 30 - Ensaio de Viabilidade por MTT, da linhagem celular melanocítica (B16-F10) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm ² , com concentrações de 111 µg/mL e 222 µg/mL.....	59
Figura 31 – <i>DotPlot</i> da linhagem B16-F10, tratadas em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm ²	60
Figura 32 – <i>DotPlot</i> da linhagem B16-F10, tratadas com nanopartículas de QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm ² , com concentrações de C1= 111 µg/mL.....	61
Figura 33 – <i>DotPlot</i> da linhagem B16-F10, tratadas com nanopartículas de QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm ² , com concentrações de C1= 222 µg/mL.....	62
Figura 34 - Ensaio de Viabilidade por citometria de fluxo, para determinação da via de morte celular, da linhagem celular melanocítica (B16-F10) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm ² , com concentrações de C1= 111 µg/mL e C2 = 222 µg/mL.....	63
Figura 35 - Microscopia confocal demonstrando a internalização do corante fotossensibilizador (QZ). Na linhagem celular NIH-3T3, após 3h de incubação com QZ/NP e realizou-se 24 h após o tratamento, em azul o DAPI – marcação nuclear, em amarelo a Quinizarina e em verde o Alexa Fluor 488 – marcação com faloidina dos filamentos de actina.	65
Figura 36 - Microscopia confocal demonstrando a internalização do corante fotossensibilizador (QZ). Na linhagem celular B16-F10, após 24h de incubação com QZ/NP, em azul o DAPI – marcação nuclear, em amarelo a Quinizarina, com a utilização do método “Z-Stack”.....	66

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais de formulações preparadas.....	30
Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos (diâmetro, índice de polidispersividade e potencial zeta) das diferentes amostras sintetizadas.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- ANOVA - *Analysis of variance* / Análise de variância
- ATCC® - *American Type Culture Collection*
- B16-F10 - Linhagem de células melanocíticas
- BSA - Albumina de soro bovino (do inglês: *bovine serum albumin*)
- CPSL - Concentrado proteico do soro do leite
- DAPI - 4',6'-diamino-2-fenil-indol (do inglês: *4',6-diamidino-2-phenylindole*)
- DMEM - *Dulbecco Eagle's minimum essential médium*
- DMSO - Dimetilsufóxido
- DLS - *Dynamic Light Scattering*
- E.S. - Extração de Solvente
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- FORM - Tipo de formulação preparada
- KCl - Cloreto de potássio
- LPc - Concentração de corante presente no sobrenadante da amostra
- MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura
- mg/mL - miligramas/ mililitros
- MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
- NIH-3T3 - Linhagem de células de fibroblastos murino
- NE - Nanoemulsão
- NSPD - Utilização ou não do Nano *Spray Dryer*
- nm - Nanômetros
- NP - Nanopartículas Poliméricas
- P.A - Princípio Ativo
- PBS - Tampão fosfato salino (do inglês: *Phosphate-buffered saline*)
- PdI - Índice de polidispersividade (do inglês: *Polydispersity Index*)
- PMMA – Poli (metil-metacrilato)
- PS- fosfatidilserina
- RPMI - *Roswell Park Memorial Institute Medium*
- QZ - Quinizarina
- SFB - Soro Fetal Bovino
- TFD – Terapia Fotodinâmica

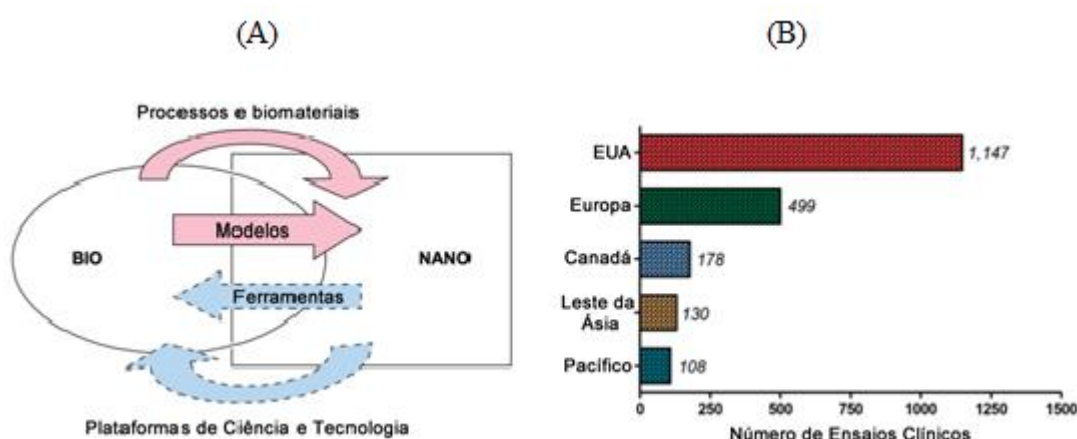
TPc - Concentração total de corante na formulação
 $\mu\text{g/mL}$ - concentração em microgramas / mililitros

1. INTRODUÇÃO

Definida como a dimensão entre 1 a 100 nm, ou abaixo de 300 nm para materiais poliméricos, a nanotecnologia trata das propriedades, da manipulação, e das estruturas destes materiais nanométricos (BARIL et al., 2012 ; PATRA, 2017). Apesar de determinado que o início da era da nanotecnologia ocorreu com a palestra de Richard Feynman em Dezembro de 1959, as nanopartículas já eram usadas por artesãos no século IX na Mesopotâmia para criar cor e efeito na superfície dos vasos, como a cor vermelha de alguns vidros que foram explicados pela presença das nanopartículas, reveladas por várias análises posteriores nas peças antigas (SCHAMING; REMITA, 2015).

A integração da nanotecnologia com a biotecnologia, gera a frente da nanobiotecnologia, cerne deste trabalho, a qual é definida como um campo do saber que aplica técnicas em nanoescala para entender e transformar biosistemas (vivos ou não vivos), utilizando princípios biológicos, materiais e modelos, para criar novos sistemas a partir da nanoescala, como pode ser visto na Figura 1(A).

Figura 1- (A) Convergência da nanotecnologia com a biotecnologia (ROCO, 2003) e (B) Distribuição do número total de ensaios clínicos utilizando nanopartículas e lipossomas nas cinco regiões de maior contribuição do mundo (OBAID et al., 2016).



Fonte: Adaptado de ROCO, 2003 e OBAID et al., 2016.

Uma das principais aplicações da nanotecnologia, é a busca do desenvolvimento e obtenção dos medicamentos, como alternativa aos medicamentos disponíveis no mercado, considerando sua eficácia reduzida devido à baixa especificidade de tratamento entre outras

desvantagens, sendo os medicamentos anticâncer (quimioterápicos) o clássico exemplo deste tipo de interação (DAVIS et al., 2010). Apesar de terem atividade terapêutica evidenciada pela indução de elevada morte celular ao sistema cancerígeno, a utilização de quimioterápicos levam a conhecidos efeitos colaterais indesejados, caracterizados principalmente, pela morte celular em tecidos saudáveis (REZA MOZAFARI et al., 2008). Um grande passo nos desenvolvimentos de sistemas nano-veiculadores foi dado, inicialmente, conforme a estratégia que busca utilizar fármacos tradicionais já aprovados, e levá-los ao mundo da nanotecnologia. Com este foco, aprovou-se em 1995 o primeiro medicamento nano-veiculado, o Doxil[®], baseado em lipossomos para entrega da doxorubicina, um quimioterápico tradicional e muito utilizado (BARENHOLZ, 2012). Esta ação teve grande impacto de mercado, gerando grande potencial para a introdução da nanotecnologia no desenvolvimento farmacêutico, favorecendo o desenvolvimento de novos projetos na fronteira científica, resultando em uma grande expansão de ensaios clínicos como visto na Figura 1(B).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste trabalho foi obter nanopartículas poliméricas de *CPSL/PMMA* – para encapsulação do corante Quinizarina utilizando-se a técnica inovadora de *Nano Spray Dryer* para aplicação na área farmacêutica com enfoque em terapia fotodinâmica (TFD).

2.1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver e caracterizar nanopartículas poliméricas contendo o corante Quinizarina;
- Determinar parâmetros físico-químicos da formulação utilizando-se espectroscopia de correlação de fótons (DLS – *Dynamic Light Scattering*);
- Determinar as características de interação do corante na formulação e sua estabilidade físico-química;
- Determinar as características morfológicas das formulações utilizando-se microscopia eletrônica de varredura;
- Determinar a internalização (*uptake*) das nanopartículas em sistemas celulares saudáveis fibroblástico e neoplásico melanômico;

- Determinar a melhor fluência de laser para morte celular nos sistemas estudados;
- Realizar estudos de viabilidade celular por MTT e citometria de fluxo;
- Realizar estudos de microscopia confocal.

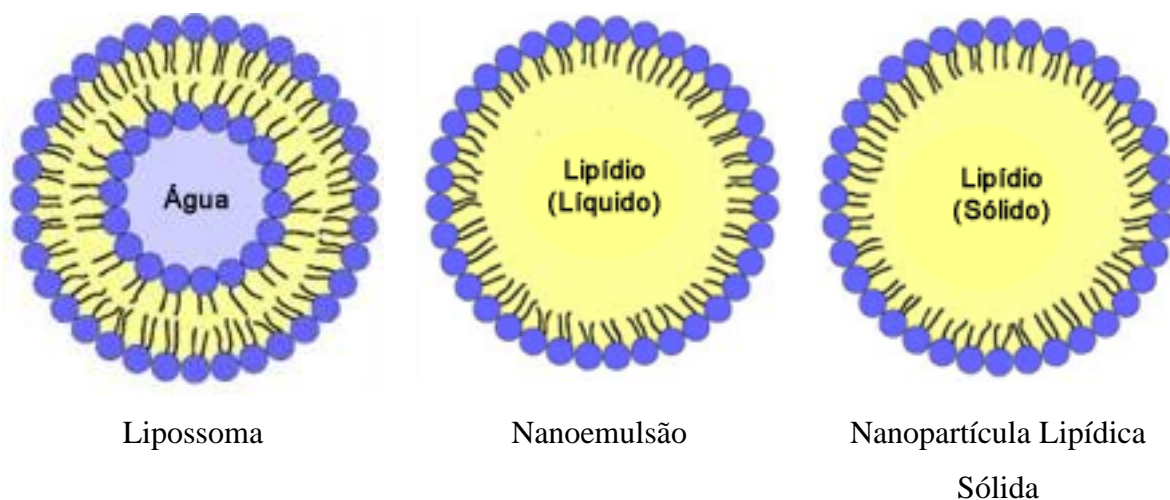
3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. NANOTECNOLOGIA FARMACÊUTICA

A nanotecnologia aplicada à área farmacêutica permite criar e desenvolver novos processos para obtenção de carreadores nanoestruturados de fármacos que possuem como diferencial maior compatibilidade biológica e por consequência uma biodistribuição modulada conforme as necessidades da patologia a ser tratada (BECHET et al., 2008; HONG et al., 2016). Pode-se destacar como uma das principais características destes sistemas avançados de carregamento de fármacos, a habilidade de interação e liberação do princípio ativo no seu sítio alvo, aumentando a especificidade do tratamento e por consequência uma melhora significativa na eficácia terapêutica (MOURA, 2011). A meia vida do fármaco por exemplo, pode ser maior, devido ao aumento da permanência do mesmo na corrente sanguínea, possibilitada pelo nanocarreador, que protege o princípio ativo da degradação química e enzimática após administração, aumentando assim sua biodisponibilidade e por consequência diminuição nos efeitos colaterais (PASZKO et al., 2011).

Dentre os diversos tipos de nanossistemas estudados para liberação de fármacos, os principais quanto ao seu uso já em fase pré-clínica e clínica são: lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas e nanoemulsões como mostrado na Figura 2. A principal diferença nestes sistemas se dá na forma, composição e características morfológicas de cada um. No lipossoma, os lipídios formam uma bicamada, com as cabeças polares para dentro e para fora respectivamente (MAZUR et al., 2017), já na nanoemulsão-uma camada simples de tensoativos recobrem a parte polar dos lipídios, os quais interagem com um núcleo líquido altamente lipofílico, (LIU et al., 2015), e nas nanopartículas lipídica-sólidas, há a formação de um núcleo semi-sólido ou líquido, e após resfriamento, ocorre a solidificação do lipídio (NASERI et al., 2015). Além dos exemplos citados, também podem ser obtidas outras estruturas, como as nanoesferas, nanocápsulas e microemulsões (DAUDT et al., 2013).

Figura 2 - Estrutura dos diferentes sistemas nanocarreadores baseados na composição lipídica.



Fonte: Adaptado de UCHECHI et al., 2014.

No processo de nano-encapsulação de ativos, como os compostos fotossensíveis, busca-se conferir vantagens, como maior taxa de internalização celular (*uptake*), melhor biodistribuição, solubilização em meio aquoso, e vantagens que propiciam a aplicação destes compostos em diversas áreas baseadas no desenvolvimento de formulações, como na indústria farmacêutica, cosmeceutica e na alimentícia (EZHILARASI et al., 2013).

3.1.1. NANOPARTÍCULAS E O MÉTODO DE ATOMIZAÇÃO

O uso de nanopartículas atrai atenção considerável no campo da nanomedicina, devido à sua aplicabilidade como sistema de liberação controlada de fármacos e uma biodistribuição mais eficaz (JUNGHANNS; MÜLLER, 2008; OBAID et al., 2016). As nanopartículas também podem ser denominadas nanocristais, quando possuem uma taxa de incorporação de fármacos bem alta comparando-se com outros sistemas nanoestruturados, atingindo um rendimento bem próximo a 100% de encapsulação em muitos casos (BABA; NISHIDA, 2013). Além disso, possuem uma área superficial de interação muito ampliada em comparação com sistemas micro e macro-estruturados, visto que sua área de superfície é aumentada pelo processo de redução de tamanho, também chamado de nanonização. As nanopartículas poliméricas contendo fármacos possuem várias propriedades especiais que conferem características únicas, incluindo

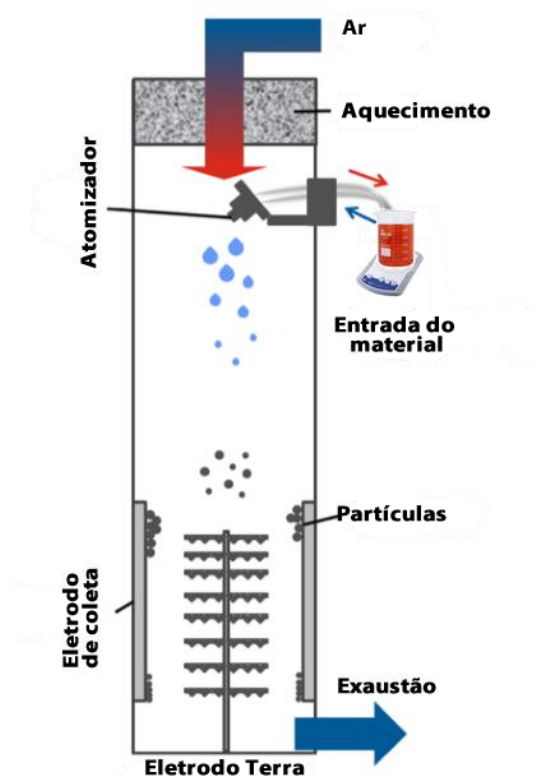
aumento da adesão às membranas celulares, maior taxa de internalização celular e otimização da cinética de biodisponibilidade de fármacos (MÜLLER et al., 2011).

Dentre as diversas técnicas para síntese de nanopartículas poliméricas, o método de pulverização e secagem sob pressão reduzida, também conhecido como “*Spray Dryer*” ou secagem por atomização, é um método de produção muito versátil e tem sido constantemente aprimorado para a preparação de nanopartículas poliméricas, por envolver a pulverização, a evaporação da solução polimérica e de solventes orgânicos, principalmente utilizando-se soluções etanólicas, e a coleta resultante das nanopartículas pulverizadas a seco (LI et al., 2010; BÜRKI et al., 2011; LEE et al., 2011). No caso da técnica de atomização por *Spray Dryer*, é muito utilizada para aplicação em indústria farmacêutica e alimentícia, o princípio de ação é baseado na aspersão de uma amostra e secagem rápida com um ciclone de gás quente (Ar, CO₂, N₂, ou mistura destes) (LI et al., 2010).

Neste trabalho utilizou-se o *Nano Spray Dryer*, que conta com um atomizador dispersando o líquido com o tamanho de gotas controlado em escala nanométrica (Figura 3). Várias soluções, misturas e formulações contendo ativos e fármacos podem ser nanoestruturados utilizando-se esta técnica, porém certas limitações têm se apresentado como desafios para seu processo de industrialização como o alto custo dos secadores. Entretanto, com a evolução dos equipamentos para nanoestruturação de fármacos, é possível a obtenção de nanoestruturas poliméricas particuladas com reprodutibilidade de tamanho e de forma controlada, propiciando a incorporação de diversas classes de fármacos insolúveis e de difícil administração pelos métodos tradicionais de tecnologia farmacêutica (FREIXO, 2013).

A empresa Büchi (Büchi Corporation, Suíça) desenvolveu um equipamento com tecnologia avançada de secador por pulverização, o *Nano Spray Dryer B-90* como ilustrado na Figura 3, que produz partículas de tamanho submicrométrico e nanométrico com alta precisão e de forma controlada, devido a malha vibratória acionada por piezoelectricidade e o coletor de partículas eletrostáticas que permite a separação destas nanopartículas e a obtenção de forma bem-sucedida, com os diferentes tamanhos de abertura de malha que podem ser utilizados para criar vários tamanhos de nanopartículas de diferentes formulações (HENG et al., 2011; SCHAFROTH et al., 2012).

Figura 3 - Esquema representativo para o equipamento *Nano Spray Dryer B-90* ilustrando a câmara de fluxo de gás, bem como o recipiente de secagem e o eletrodo de coleta de material nanoparticulado (WANG et al., 2016).



Fonte: Adaptado de WANG et al., 2016

As nanopartículas podem ser empregadas em diversas áreas na indústria têxtil, indústria alimentícia, cosmeceutica, produção de fertilizantes, indústria farmacêutica sendo utilizada para o tratamento do câncer. (MEBERT, et al., 2017).

3.2. CÂNCER

O “câncer” pode ser definido como a multiplicação descontrolada e a proliferação de formas anormais de células do corpo. O termo neoplasia, refere-se ao “crescimento novo” de células, gerando os tumores que podem ser benignos ou malignos, sendo diferenciados pela sua capacidade de invadir tecidos adjacentes ou não e quando ocorre a formação de metástases são classificados como malignos-(RANG et al., 2015). As células cancerígenas possuem suas funções debilitadas, e podem atingir órgãos com outros tipos celulares, ao invadir um tecido e

ocupar o local das células saudáveis, o tecido ou órgão invadido perde suas funções com a progressão da doença. (ALMEIDA et al., 2005).

Os fatores para o surgimento do câncer são diversos podendo ser externos ou internos ao organismo doente e ainda podendo estar inter-relacionados. Enquanto os fatores internos são, na maioria das vezes, geneticamente pré-determinadas e estão relacionadas à capacidade do organismo de se defender das agressões externas, os fatores externos são aquelas relacionadas a exposição ao meio ambiente e hábitos. As células cancerígenas, podem migrar para outros tecidos próximos ou ao atingirem vasos sanguíneos e linfáticos, conseguem ir até órgãos mais distantes, dando início as metástases.

3.2.1. CÂNCER DE PELE

O câncer de pele é um problema de saúde mundial dentre os diversos tipos de câncer (OMS, 2019), os fatores de risco individuais para o câncer podem ser relacionados ao tipo de pele clara; olhos azuis, verdes ou marrons; cabelos claros; uma tendência a queimar em vez de bronzear; um histórico de queimaduras graves; sardas; e uma história familiar de câncer de pele (HORA et al., 2003). Além desses fatores individuais, raios ultravioleta (UV), infecção por HPV, radiação infravermelha, trauma, imunossupressão, e dentre outras doenças, inclusive genéticas também podem aumentar o risco de desenvolver este tipo de câncer, embora o câncer de pele seja uma doença prevalente, é uma doença maligna evitável e altamente tratável e resulta em uma estatística de morte em um nível mínimo no caso do diagnóstico precoce (KATALINIC et al., 2012; ANDSOY et al., 2013; ÇELIK et al., 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a incidência de cânceres de pele não-melanômico e melanômico tem aumentado nas últimas décadas. Atualmente, entre 2 e 3 milhões de cânceres de pele não-melanoma e 132.000 cânceres de pele de melanoma ocorrem no mundo a cada ano (OMS, 2019). O melanoma é a forma mais agressiva de câncer de pele e é caracterizado pela proliferação anormal dos melanócitos que invadem a membrana basal (SIWAK et al., 2005). Em casos mais avançados, quando os melanócitos tornam-se invasivos, o tratamento do melanoma ainda permanece impotente, resultando em tumores sólidos com difícil tratamento (JACK et al., 2006).

No Brasil o câncer de pele é o mais frequente, cerca de 30% de todos os tumores malignos registrados. O melanoma corresponde a 3% das neoplasias malignas do órgão, ele é o tipo mais grave devido a sua alta possibilidade de provocar metástase. O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado em sua fase inicial. Estimativa de novos

casos no Brasil: 6.260, sendo 2.920 homens e 3.340 mulheres de acordo com o INCA em 2018 e o número de mortes no Brasil: 1.794, sendo 1.012 homens e 782 mulheres segundo o INCA em 2015.

As principais abordagens para o tratamento do câncer atualmente são a excisão cirúrgica, radiação ionizante (radioterapia), e tratamento farmacológico com quimioterápicos, dependendo do local acometido e de seu estágio de desenvolvimento (RANG et al., 2015). Estima-se que em 2020 o número de casos de câncer no Brasil seja em torno de 15 milhões anuais segundo a ONU no ano de 2019.

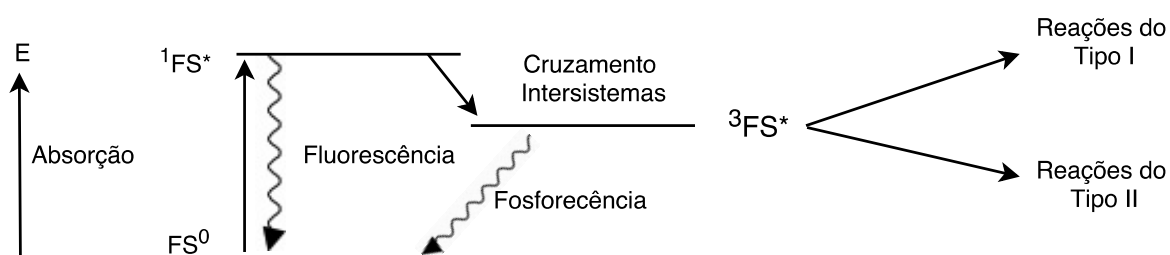
3.2.2. TERAPIA FOTODINÂMICA

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é um procedimento terapêutico clinicamente aprovado e minimamente invasivo que pode exercer uma atividade citotóxica fotoinduzida e seletiva para células malignas (SETLIK; SILVA, 2016). O procedimento envolve administração de um agente de fotossensibilizante via tópica ou sistêmica, seguido de irradiação a um comprimento de onda correspondente para uma banda de absorvância deste ativo denominado fotossensibilizador (AGOSTINIS et al., 2011). Esta terapia vem sendo utilizada como coadjuvante às terapias tradicionais para o tratamento do câncer e outras doenças, baseando-se em reações fotoquímicas específicas induzidas no tecido, a partir da interação de agentes fotossensibilizantes, de irradiação com luz monocromática na dose adequada e oxigênio molecular ($^3\text{O}_2$), sendo este último convertido fotoquimicamente em oxigênio singlete ($^1\text{O}_2$), além da produção de outras Espécies Reativas de Oxigênio - EROS ($^1\text{O}_2$, $\text{O}_2^{\bullet-}$, $\bullet\text{OH}$, H_2O_2), e espécies radiculares derivadas de macromoléculas biológicas ($\text{CH}_3\bullet$, $\text{NO}_2\bullet$, $\text{R-CO}_2\bullet$) (PASZKO et al., 2011). Estas espécies reativas desencadeiam processos biológicos foto-oxidativos que resultam na morte celular, seja por apoptose, necrose ou autofagia. (ROSENKRANZ et al., 2000; PRIMO, 2009; PASZKO et al., 2011).

Estes processos de transições eletrônicas e conversões fotoquímicas (Figura 5) podem gerar reações de dois tipos, as quais são denominadas de mecanismos fotodinâmicos clássicos (CASTANO et al., 2004). No mecanismo do **Tipo I**, há a abstração de um átomo de oxigênio ou reações de transferência de elétrons entre o fotossensibilizador no estado tripleto excitado e diferentes macromoléculas biológicas, levando à formação de radicais livres e/ou íons radicais. Poucos materiais biológicos apresentam facilidade de fotoredução, sendo que as espécies reduzidas podem transferir um elétron ao oxigênio molecular presente no meio (em

configuração tripleto), formando espécies reativas de oxigênio como peróxidos de hidrogênio, anión superóxidos, etc. (PLAETZER et al., 2009; CERIZE, 2012). No mecanismo do **Tipo II** há transferência de energia direta para o oxigênio molecular a partir da configuração eletrônica tripleto do ativo, induzindo a formação do oxigênio singleto (1O_2). O oxigênio singleto é uma espécie altamente reativa que interage de forma a oxidar vários substratos biológicos. Acredita-se que o oxigênio singleto seja o principal mediador dos efeitos fotodinâmicos nos sistemas biológicos, isso porque causa danos às várias estruturas celulares, induzindo quebra de DNA, destruição da membrana plasmática e de organelas como lisossomos e mitocôndrias, que em conjunto ou separadamente induzem a morte da célula doente (BARBUGLI et al., 2010; DE PAULA et al., 2017).

Figura 4 - Diagrama simplificado do mecanismo fotodinâmico. (KONAN et al., 2002).



Fonte: traduzido e adaptado de KONAN et al., 2002.

A associação da nanotecnologia e a TFD é uma estratégia bem-sucedida que levam a resultados promissores e são atraentes como ferramentas auxiliares em complementação a terapias convencionais (CALIXTO et al., 2016). Estas duas áreas juntas podem propiciar o desenvolvimento de novas formulações, medicamentos e procedimentos terapêuticos, com maior eficácia e atividade no tratamento de diversos tipos de patologias da doença. Na Figura 6, há uma representação da estratégia geral do estudo, baseada no desenvolvimento de um sistema nanoparticulado polimérico, uma nanoesfera matricial com recobrimento polimérico. Estas nanopartículas poliméricas podem liberar de forma controlada e sustentada, princípios ativos, como os fotossensibilizadores utilizados em TFD. Neste contexto, o cerne deste trabalho foi então desenvolver e caracterizar uma nanopartícula polimérica contendo o corante Quinizarina, como proposta de novo fotossensibilizador aplicado em TFD. Destaca-se a utilização da técnica *Nano Spray Dryer*, para obtenção das nanopartículas visando potencial de

escalonamento pela indústria farmacêutica com vistas de aplicação como futuro medicamento para tratamento do câncer de pele melanômico e podendo ainda ser utilizado como tratamento para outros tipos de cânceres.

Figura 5 - Exemplo de uma nanopartícula para liberação de fármaco, e ativada pela presença de luz para emissão de espécies reativas para tratamento com Terapia Fotodinâmica (OBAID et al., 2016).



Fonte: Traduzido e adaptado de OBAID et al., 2016.

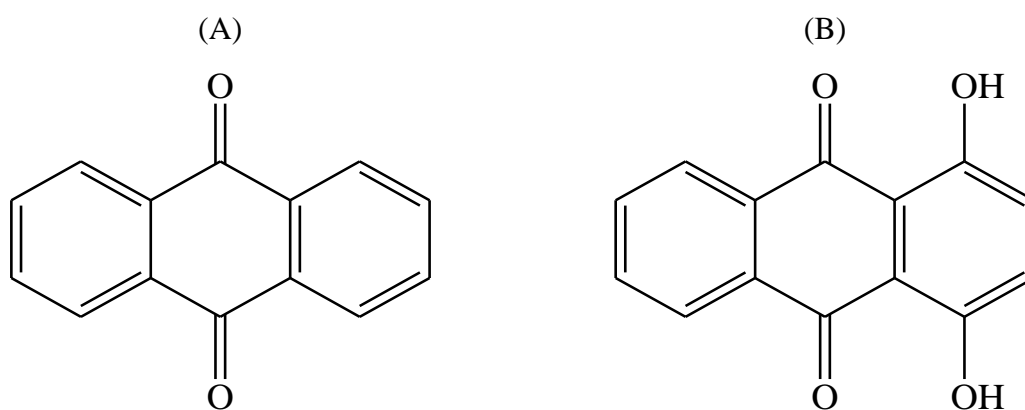
3.3 CORANTES: CONCEITO, CLASSIFICAÇÃO E PRINCIPAIS APLICAÇÕES

Há relatos de que ainda na Era primitiva dos seres humanos, os recursos naturais da fauna e flora já eram explorados para produzirem as primeiras colorações em fibras têxteis, se tornando um marco histórico até o surgimento da primeira invenção do corante sintético (*Mauveína*), descoberto por acaso pelo estudante Perkin (PERKIN, 1879). Os corantes sintéticos são derivados de compostos orgânicos ou inorgânicos e são categorizados com base na sua estrutura química, levando-se em consideração a fonte do material e sua natureza, estruturas, natureza dos seus respectivos cromóforos e as ligações específicas (HSIAO et al., 2014; ZHANG, 2014).

Os corantes podem ser divididos em diferentes grupos como: corantes orgânicos, reativos, básicos, de oxidação, ópticos/fluorescentes, branqueadores, dispersivos, ácidos, azóicos, antraquinóides, indigóides e de enxofre (MUHD JULKAPLI et al., 2014). Eles são amplamente utilizados nos produtos têxteis, couro, alimentos, cosméticos, nas indústrias de produtos de papel, na agroindústria, em células foto-eletróquímicas e indústria farmacêutica (MARTÍNEZ-HUITLE; BRILLAS, 2009).

As antraquinonas, por exemplo, são membros importantes da família das quinonas e constituem uma grande variedade estrutural de compostos derivados do grupo policetídeo como observados na Figura 4. São importantes na química de corantes e apresentam propriedades químicas capazes de modular sua absorção e emissão de acordo com a posição e o tipo de substituinte molecular. As antraquinonas (Figura 4A) são estruturalmente construídas a partir de um anel de antraceno com um grupo ceto como núcleo básico e diferentes grupos funcionais podem substituir em várias posições. Além do mais, os derivados de antraquinona apresentam uma ampla gama de atividades farmacológicas, incluindo efeitos laxativos, antimicrobiano, antifúngico, antiviral e neuroprotetor (MONTROYA et al., 2005; FOUILLAUD et al., 2018).

Figura 6 – Estrutura química básica da antraquinona (A), e estrutura química simétrica da Quinizarina - QZ (B).



Fonte: elaborada pela Autora.

Há um interesse contínuo no desenvolvimento de novos derivados de antraquinona que exibem atividades biológicas, pois estes derivados de antraquinona, que são utilizados na prática clínica e incluem tetraciclina como antibióticos, doxorrubina como quimioterápicos, hidroxiantraquinonas naturais usadas principalmente como laxantes (DUVAL et al., 2016; MALIK; MÜLLER, 2016).

Entretanto, as antraquinonas possuem certas desvantagens devido a sua baixa solubilidade em meio aquoso, tal como a Quinizarina- QZ (Figura 4B), que tem uma solubilidade muito baixa (HAYNES, 2014). Desta forma a sua administração não é tão eficiente devido a sua biodistribuição que seria limitada, exigindo altas doses terapêuticas. Diante deste cenário carrear este corante em um sistema nanoestruturado é uma maneira de aumentar sua eficácia.

Como citado anteriormente, os sistemas nanoestruturados proporcionam maior seletividade e podem garantir melhor estabilidade físico-química dos ativos incorporados (FREIXO, 2013). No caso de nanopartículas poliméricas, o polímero utilizado influencia na estrutura e estabilidade do sistema. O concentrado proteico do soro do leite (CPSL) é composto por proteínas globulares, α -lactalbumina, BSA (albumina de soro bovino), imunoglobulinas, peptídeos, derivados de caseína e β -lactoglobulina, esta última correspondendo a 50% das proteínas totais. Estas proteínas possuem propriedades funcionais importantes como a solubilidade em água, capacidade de atuar como emulsificante, tendo uma grande compatibilidade biológica, o que as tornam excelentes para a produção de nanopartículas (YOSHIDA, 2002; MEHRAVAR et al., 2009).

O Poli (metil-metacrilato) ou simplesmente PMMA é o mais importante dos polímeros da família dos acrilatos. Se destaca, por apresentar boa performance vítrea, resistência a fatores externos como o tempo, transparência e excelente estabilidade dimensional (PARRA et al., 2005). Além disso, foi o primeiro polímero acrílico a ser utilizado para preparo de biomaterial, e apesar de não ser biodegradável, é biocompatível. Essa classe de polímeros pode ser conjugada com proteínas, biomoléculas e ingredientes farmacêuticos ativos, encontrando usos promissores nas áreas de sistemas de liberação de fármacos, engenharia de tecidos, construção de biomateriais, dentre outros (FEUSER et al., 2015).

A coloração de polímeros é geralmente obtida pela mistura de corantes aos ingredientes poliméricos. Contudo, em muitos casos as cores desbotam ou mudam rapidamente, também perdendo suas propriedades mecânicas quando expostas à luz solar. O PMMA já foi estudado anteriormente demonstrando que este material foi amplamente utilizado e testado, demonstrando potencial de aplicação devido à sua termoestabilidade, a sua fluorescência característica, e resistência à água e a outros solventes orgânicos. (DOLLENDORF et al., 2013).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Os reagentes químicos descritos a seguir foram empregados sem nenhum tipo de purificação ou modificação, todos os solventes utilizados foram de alta pureza e solventes com grau de pureza analítica.

Foram utilizados os seguintes materiais: Epikuron 170 (Lucas Meyer/SA), Pluronic F68 (Sigma-Aldrich), Acetona (J.T. Baker), Quinizarina 96%” (Sigma-Aldrich), concentrado de proteínas do soro do leite (CPSL) gentilmente cedido por (Supley Laboratório - Brasil), Crodamol GTCC-LQ-(BR), gentilmente cedido por (CRODA do Brasil), PMMA (Acros Organics), Acetonitrila (J.T. Baker), Dimetilsulfóxido (Sigma-Aldrich). Para preparo das formulações, soluções e diluições foi utilizada água ultrapura *Milli-Q* obtida do purificador modelo Direct 3 (Milipore, Cotia, SP). Para cultura de células, citometria de fluxo e microscopia confocal foram utilizados os seguintes reagentes: meio de cultura celular DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium - GIBCO Cell Culture, Carlsbad, CA, USA) e meio de cultura celular RPMI-1640 (GIBCO Cell Culture, Carlsbad, CA, USA) suplementado com soro fetal bovino (*Fetal Bovine Serum* – FBS, Corning Incorporated), aminoácidos não-essenciais (Gibco), antibióticos PenStrep (Gibco), anfotericina (Gibco), além disso foram utilizados tripsina-EDTA 1X (Corning Incorporated) e tampão fosfato salino PBS (*Phosphate Buffered Saline*), brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio - MTT (Sigma-Aldrich), KIT Guava Nexin (Merck Milipore, EUA), Paraformaldeído (Sigma-Aldrich), Glicina (Sigma-Aldrich), Triton X-100 (Sigma-Aldrich), Alexa Fluor 488 – Faloidina (Life Technologies), ProLong® Diamond Mounting Medium with DAPI (Life Technologies).

4.2. PREPARO DAS NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO QUINIZARINA

Inicialmente foi efetuado um estudo de variação da composição das possíveis formulações a serem preparadas, com presença e ausência dos seguintes componentes: ativo (Quinizarina), Proteína do soro de leite, PMMA, e utilizando o preparo de pré-formulações (nanoemulsões estabelecidas em trabalhos posteriores do grupo, Primo et al. (2009), as quais foram preparadas nas seguintes composições, conforme a Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 – Condições experimentais de formulações preparadas

AMOSTRA	FORMULAÇÃO	E.S	CPSL	PMMA	NSPD
AMOSTRA 1	NE-V	Sim	Não	Não	Não
AMOSTRA 2	NE-QZ	Sim	Não	Não	Não
AMOSTRA 3	NE-QZ	Sim	Sim	Não	Não
AMOSTRA 4	NP-QZ	Não	Sim	Sim	Sim
AMOSTRA 5	NP-V	Não	Sim	Sim	Sim
AMOSTRA 6	NP-QZ	Não	Sim	Sim	Sim
AMOSTRA 7	NP-V	Não	Sim	Sim	Sim

*NE V- Nanoemulsão vazia/ *NE QZ- Nanoemulsão de Quinizarina

*NP V- Nanopartícula Vazia/*NP QZ-Nanopartícula de Quinizarina

Fonte: elaborada pela Autora.

As diferentes amostras foram preparadas para se avaliar diferenças de carga e tamanho, para iniciar os estudos com a Quinizarina, verificou-se a solubilidade da mesma em diferentes solventes orgânicos, e em diferentes possíveis lipídeos carreadores, sendo altamente solúvel em DMSO e no Crodamol GTCC-LQ-(BR). Como o sistema de *Nano Spray Dryer* foi utilizado no modo aberto (sem utilização do sistema *Inert Loop* de recuperação de solventes orgânicos), a amostra conteve menos que 5% v/v de solvente para evitar auto-ignição da amostra, e a escolha da acetona em proporção de 3% v/v foi o ideal. A partir disto, foi desenhado o processo de preparo da formulação, baseado em uma pré-nanoemulsão como base, as quais foram preparadas as amostras 1 e 2, a fim de se verificar se a produção de uma emulsão clássica e já padronizada seria possível incorporar o novo corante (QZ). Assim foi realizada a etapa de pré-formulação sem adição de outros solventes, contendo os ativos básicos empregando-se a técnica de emulsificação espontânea sob pressão reduzida, de acordo com a metodologia descrita por Primo et al. 2009, com adaptações. Este método consiste no preparo de uma solução aquosa de tensoativo aniônico Pluronic F68 sob agitação magnética em temperatura ambiente à 25°C. Na sequência foi preparada uma solução de Epikuron 170 em acetona, sob agitação moderada à 55 °C. Nesta fase orgânica adicionou-se 250 µL de Crodamol GTCC-LQ-(BR), que foi utilizado para solubilização do corante de QZ em um banho de ultra-som 2210 (Branson Ultrasonics Corporation, Danbury, CT, EUA). Após total homogeneização, a fase orgânica foi adicionada lentamente por gotejamento, com auxílio de uma bomba de infusão modelo *Infusion Syringe*

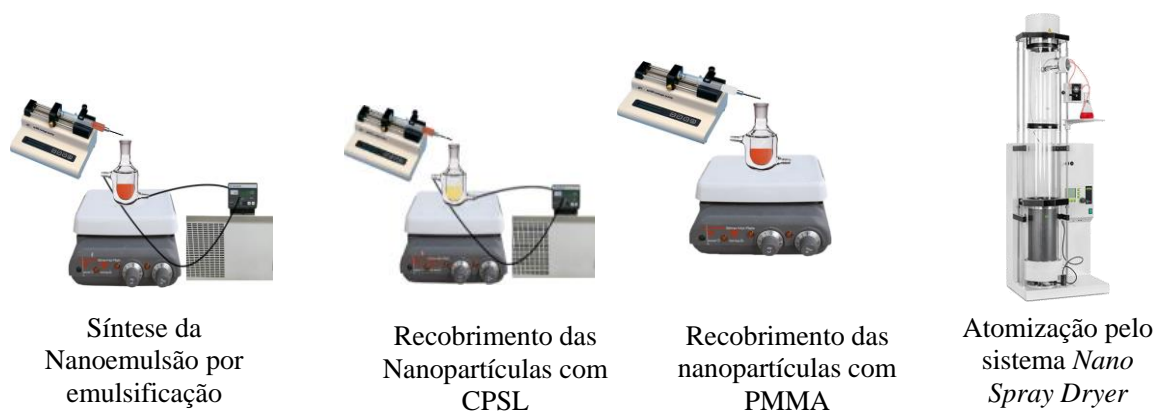
Pump 100i (WPI Sarasota, FL, EUA), diretamente à solução aquosa (55 °C) iniciando-se o processo de emulsificação espontânea sob agitação magnética a 250 rpm, em seguida esta amostra foi levada a um rota-evaporador onde foi removido o solvente orgânico (acetona) sob pressão reduzida a 55°C na fase final do processo de emulsificação para obtenção da pré-formulação.

Após o preparo das pré-formulações, partiu-se para a preparação das nanopartículas poliméricas pelo método de *Spray Dryer*, conforme descrito por (LI et al., 2010). Para isto, o método de secagem por spray foi testado com as seguintes variações:

- A) Adição do CPSL e PMMA, para testes em emulsão, sem *Spray Dryer*.
- B) Adição da emulsão no concentrado de proteínas de leite, seguida da adição do PMMA, e *Spray Dryer*, perfazendo assim as amostras 4 e 5.
- C) Adição da emulsão no concentrado de proteínas de leite (sob temperatura), seguida da adição do PMMA (sob temperatura), e *Spray Dryer*, perfazendo assim a amostra 6.
- D) Adição da emulsão no concentrado de proteínas de leite (sob temperatura), seguida da adição do PMMA, e *Spray Dryer*, perfazendo assim a amostra 7.
- E) Replicatas das amostras 4 e 5 para confirmação do método e uso em testes biológicos, perfazendo assim as amostras 8 e 9.

Sendo assim, o método de preparo das nanopartículas foi então definido em um protocolo de quatro etapas. Inicialmente foi preparada uma pré-nanoemulsão, conforme descrito acima, com a não evaporação do solvente, na segunda etapa, a nanoemulsão foi dispensada com velocidade controlada sob agitação magnética a 250 rpm em um concentrado proteico do soro do leite, e aguardou-se a solubilização. E por fim, esta foi adicionada a uma solução contendo acetona e PMMA que foram previamente solubilizados, e mantido sob agitação de 1000 rpm. Na sequência empregou-se o sistema Nano Spray Dryer B-90 (Büchi, Flawil, Suíça), para aspersão da solução e obtenção das amostras nano-particuladas e secas, processo demonstrado na Figura 7.

Figura 7 - Esquema resumido representando o protocolo geral para preparo das Nanopartículas poliméricas para associação do corante Quinizarina.



Fonte: Elaborada pelo Autor.

Após a formulação líquida ser atomizada e seca, a mesma foi retirada na forma de pó do compartimento eletrostático para armazenamento como apresentado na Figura 8. As amostras então foram pesadas e armazenada em dessecador, e em seguida foram efetuadas caracterizações espectroscópicas de absorção no UV-Vis e de emissão de fluorescência para a QZ/NPP, obtenção de tamanho de partícula (d), índice de polidispersividade (PdI), e potencial Zeta (ζ), conforme procedimentos experimentais descritos a seguir. Além disso foram obtidas micrografias por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

Figura 8 - Fotos do eletrodo e coleta da amostra após a atomização pelo *Nano Spray Dryer*.



Fonte: Elaborada pelo Autor.

4.3. MÉTODO ESPECTROANALÍTICO PARA QUANTIFICAÇÃO DO CORANTE POR ESPECTROSCOPIA DE UV-VIS E FLUORIMETRIA.

Inicialmente foram preparadas curvas padrão por espectroscopia de absorção no UV-Vis e emissão de fluorescência do corante QZ. Foi preparada uma solução estoque em dimetilsufóxido (DMSO) e foram feitas adições sucessivas diretamente em uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico modelo QS-10 (*Hellma GMBH & Co*, Alemanha), em acetonitrila com auxílio de microsseringa de vidro de 10 μL . Os valores dos máximos de absorbância obtidos foram correlacionados com a concentração em $\mu\text{mol/L}$ conforme a *Lei de Lambert-Beer*.

A linearidade foi obtida utilizando um espectrofotômetro de duplo feixe modelo Ultrospec 7000 (*GE Healthcare Life Sciences*, Suécia) e um espectrofluorímetro modelo *Horiba Jobin Ivon-Spex Fluorolog* (*Horiba, EUA*). O espectro de varredura do espectrofotômetro de absorção UV/Vis para a determinação da Quinizarina foi ajustado de 300 a 600 nm. Já a emissão de fluorescência foi analisada entre 500 e 700 nm, com excitação fixa em 470 nm, e as aberturas de emissão e excitação (fendas) foram ajustadas em 3 nm. A determinação da linearidade da Quinizarina para obtenção da curva média padrão foi feita em triplicata contendo quatorze concentrações diferentes, variando-se de 10 - 130 $\mu\text{mol/L}$ para análises em espectrofotômetro de absorção UV-Vis; e 0,4 - 4,0 $\mu\text{mol/L}$ para análises em espectrofluorímetro. A faixa de concentração é reduzida devidos especificidades da técnica de fluorimetria que permite linearidade para intervalos de concentrações menores.

4.4. DETERMINAÇÃO DA TAXA DE INCORPORAÇÃO DO CORANTE NA NANOPARTÍCULA

Para determinação da taxa de incorporação do corante nas diferentes nanopartículas preparadas foi utilizado o seguinte método: inicialmente pesou-se uma massa de cerca de 10,0 mg de nanopartículas, estas foram adicionadas em 60 μL de DMSO e colocadas em banho ultra-som (*Branson Ultrasonics Corporation*, Danbury, CT, EUA) por 30 minutos sob aquecimento (60 °C). Em seguida esta solução foi adicionada a 1840 μL de acetonitrila em uma cubeta de quartzo de 10 mm de caminho óptico, e foram obtidos os espectros de absorção e de fluorescência, com os máximos centrados em 470 nm e 575 nm respectivamente. Estes valores

foram utilizados na construção das curvas padrão de calibração e na determinação das concentrações de QZ. A concentração então foi determinada na massa de quinizarina presente na amostra, e então expressada em mg de QZ/g de nanopartículas.

Em seguida foram efetuados os cálculos de rendimento, de acordo com o valor de QZ adicionado e a massa de nanopartículas obtidas após o spray dryer, e então expressos em porcentagem.

$$\text{Quantidade de QZ na nanopartícula} = \frac{QZ(mg)}{QZ_{total} (g)}$$

4.5. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULAS PELA TÉCNICA DE ESPALHAMENTO DINÂMICO DE LUZ (DYNAMIC LIGHT SCATTERING – DLS)

O diâmetro hidrodinâmico das nanopartículas poliméricas foi determinado empregando-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz. Foram avaliados os tamanhos das partículas na ausência e presença do corante, verificando a influência direta da incorporação destes na pré-formulação e no sistema particulado final, avaliando também potencial Zeta (ζ) e o índice de polidispersividade (PDI) das amostras. As amostras foram preparadas em água ultrapura usando fator de diluição de 1:100 por análise da pré-atomização; e para a leitura das amostras após a técnica de atomização foram pesadas 0,50 mg do sólido e diluídas em 2,0 mL de água *Milli-Q*. Todas as análises foram realizadas em triplicata a 25°C. As leituras foram realizadas utilizando os conjuntos de cubetas de poliestireno e eletrodos modelo DTS1070, do equipamento Zetasizer (Nano-ZS, Malvern Instruments, Reino Unido).

4.6. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

As análises morfológicas das nanopartículas poliméricas (NP) foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV), na resolução máxima de 500 × e 20 kV. A superfície das NP foi avaliada utilizando-se um microscópio eletrônico Zeiss, modelo EVO 50 (Carl Zeiss, Cambridge UK). As amostras foram previamente revestidas com uma camada ultrafina de ouro (Bal-Tec, SCD 050 Sputter Coater, Liechtenstein) para definição de resolução

óptica, conforme protocolo convencional para análise neste tipo de equipamento. Todas as análises foram realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica de Varredura e Microanálise Elementar do Departamento de Química da FFCLRP, da Universidade de São Paulo – USP em Ribeirão Preto.

4.7. CULTURA CELULAR

4.7.1. EXPANSÃO E CULTURA

A linhagem NIH-3T3 (ATCC[®] CRL-1658) e B16-F10 (ATCC[®] CRL-6475TM) derivado de células fibroblastóides de camundongos e células epiteliais melanômicas de rato, respectivamente, foram obtidas da *American Type Culture Collection* (ATCC), e expandidas em garrafas de cultura tratada (Corning Incorporated, estéril, 75 cm²). Para a linhagem NIH-3T3 foi utilizado 10,0 mL de meio DMEM enriquecido com 10% de SFB, 1% estreptomicina/eritromicina e 0,5% de anfotericina e 1% de aminoácidos. Para a linhagem B16-F10 utilizaram-se 10,0 mL de meio RPMI-1640 enriquecido com 10% de SFB, 1% estreptomicina/eritromicina e 0,5% de anfotericina. As garrafas de cultura foram colocadas na incubadora a 37°C com 5,0 % de CO₂ até atingir o estágio de total confluência. Posteriormente, foram efetuadas a repicagem das células, utilizando 2,0 mL de uma solução de tripsina 0,05% (Corning Incorporated) para remover as células aderidas na garrafa, permanecendo em contato com a solução por 5 minutos em incubadora a 37°C com 5,0 % de CO₂, e depois inativadas com o respectivo meio completo. Para o processo de congelamento, utilizou-se 1,0 mL de suspensão de células (contendo de 1,0 a 1,5 x 10⁶ células), em tubos criogênicos (Corning Incorporated, 1,5 mL) contendo uma solução de congelamento composta de 90% de SFB e 10% de DMSO, a qual foi previamente filtrada. Os tubos criogênicos foram armazenados em *ultra-freezer* a -80°C em *container* apropriado (*Mr. FrostyTM Freezing Container*, Thermo Scientific - USA), projetados para atingir uma taxa de resfriamento de -1°C por minuto, e mantidos neste container por 24h. Em seguida transferidos para *Cryoboxes* e mantidos em nitrogênio líquido (-196 °C), para posterior utilização.

4.7.2. ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO CELULAR

Foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células/poço em 3 placas de 96 poços (*Costar*, Corning Incorporated), em seguida as células foram então incubadas por 24h para adesão superficial. No segundo dia foram então incubadas com as formulações vazias e contendo Quinizarina em diferentes concentrações (de 08 a 268 $\mu\text{g/mL}$) por 3h. Após este tempo de internalização, as células foram lavadas 3 vezes com solução estéril de PBS para remoção de quaisquer partículas/corante não internalizados, e então adicionaram-se 100 μL de meio RPMI 1640 sem a presença do indicador vermelho de fenol (*Sigma-Aldrich*), e foi efetuada a leitura das emissões de fluorescências de todos os poços com excitação fixa em 470 nm (fenda de 10 nm), e aquisição de espectro de emissão região de 500 a 700nm, com fenda de 10 nm, diretamente na placa de cultura de 96 poços na leitora *Cytation 5 - Cell Imaging Multi-Mode Reader* (Biotek Instruments, Winooski, VT, USA). O tratamento de dados foi feito obtendo os espectros de emissão de quinizarina nanoparticulada, e para as amostras de NP sem ativo (controle). Os espectros de células incubadas com quinizarina, obtidos de cada poço, foram analisados e efetuadas as médias para cada concentração, e então foram subtraídos dos espectros das células com nanopartículas vazias, para assim obter-se o espectro final de emissão para as diferentes concentrações de QZ.

4.7.3. CITOTOXICIDADE DAS NPS EM CONDIÇÃO DE ESCURO

Foram plaqueadas $1,5 \times 10^4$ células/poço em 3 placas de 96 poços (*Costar*, Corning Incorporated), em seguida as células foram então incubadas por 24h para adesão superficial. Na sequência foram incubadas com as formulações vazias e contendo QZ em diferentes concentrações, de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ a 268 $\mu\text{g/mL}$, por 3h. Após internalização as células foram lavadas 3 vezes com solução estéril de PBS para remoção de quaisquer partículas/corante não internalizados, e após 24h foi efetuado o ensaio de citotoxicidade de MTT, conforme descrito na literatura (MOSMANN, 1983). O método baseia-se na utilização de uma solução de MTT (5,0 mg/mL) preparada em PBS previamente esterilizada em membrana filtrante. Para execução do ensaio retirou-se todo o meio de cada poço e adicionou-se 200 μL de MTT, e incubaram-se as placas por 4 horas (37°C e 5% CO_2). Após a incubação para produção do composto formazan pelas células viáveis, removeu-se todos o meio cuidadosamente, e adicionaram-se 200 μL de isopropanol a cada poço, homogeneizando os utilizando-se um Shaker para placas (IKA KS

260) por 10 minutos. Em seguida realizou-se a leitura das absorções em 560 e 690 nm, utilizando-se a leitora de microplacas *Biotek Cytation 5 - Cell Imaging Multi-Mode Reader* (Winooski, VT, USA). Por fim, a etapa de tratamento de dados foi realizada a partir dos cálculos de viabilidade em relação ao controle (células viáveis sem tratamento) considerando os limites de confiabilidade estatística e os testes de análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e o pós teste para múltiplas comparações de *Tukey*, conforme algoritmo do *software* Prism.

4.7.4. FOTOTOXICIDADE DAS NPS EM CONDIÇÃO DE LUZ

Foram plaqueadas $4,0 \times 10^4$ células/poço em 3 placas de 24 poços (*Costar*, Corning Incorporated), em seguida as células foram então incubadas por 24h para adesão. Na sequência foram então incubadas com as formulações vazias e contendo QZ em concentração de 111 e 222 $\mu\text{g/mL}$ por 3h. Após este período de internalização as células foram lavadas 3 vezes com solução estéril de PBS para remoção de quaisquer partículas/corante não internalizados, e após 24h foi iniciado o estudo de fototoxicidade, sendo aplicadas diferentes fluências com um LED Odontológico modelo LEC-Plus (MMO, São Carlos, Brasil) com comprimento de onda de 450 (± 20 nm) nas doses de 1,0 a 25 J/cm^2 . Na sequência, após 24h, foi feito o ensaio de citotoxicidade de MTT, conforme descrito na literatura (MOSMANN, 1983), com a solução de marcador preparada em solução estéril de PBS a 5 mg/mL . Então retirou-se todo o meio de cada poço, adicionaram-se 200 μL desta solução de MTT, e incubou-se as placas por 4 horas (37°C e 5% CO_2). Posteriormente a formação do composto Formazan pelas células viáveis, removeu-se o meio cuidadosamente, e adicionou-se 200 μL de isopropanol a cada poço, homogeneizando-se com auxílio de um *Shaker* de bancada (IKA KS 260) pelo tempo de 10 minutos para cada placa. Assim realizaram-se as leituras das absorções em 560 e 690 nm, na leitora de microplacas *Biotek Cytation 5 - Cell Imaging Multi-Mode Reader* (Winooski, VT, USA). Por fim, a etapa de tratamento de dados foi realizada a partir dos cálculos de viabilidade em relação ao controle (células viáveis sem tratamento) considerando os limites de confiabilidade estatística e os testes de análise de variância ANOVA ($p < 0,05$) e o pós teste para múltiplas comparações de *Tukey*, conforme algoritmo do *software* Prism.

4.7.5. CITOMETRIA DE FLUXO (ANÁLISE DE VIA DE MORTE CELULAR)

Para a realização dos estudos de citotoxicidade e fotocitotoxicidade da TFD para avaliar a via de morte celular foi utilizado o *Kit Guava Nexin* (Merck Millipore). As células melanocíticas foram semeadas em placas de cultura de 24 poços (Corning Incorporated, EUA), e o tratamento com diferentes doses, foi feito conforme o protocolo realizado para o tratamento de MTT. Após o tratamento com as nanopartículas, retirou-se o meio que estava nos poços, e colocou-se em microtubos do tipo *Eppendorf* identificados, e adicionaram-se 200 μL de uma mistura tripsina-acutase (1:1). As células foram coletadas, poço a poço e colocou-se em cada microtubo identificado, centrifugou-se a 5 $^{\circ}\text{C}$ e 1000 rpm por 5 minutos. Descartou-se o meio, e o ressuspendeu em 200 μL da solução do reagente do *kit*, que foi utilizado para a determinação de células viáveis e mortas baseadas na marcação celular com os corantes específicos de cada *kit* comercial. As mesmas foram incubadas por 20 minutos no escuro, transferindo-as, na sequência, para placas de 96 poços de fundo redondo (GlobalPlast, China), e analisadas diretamente no citômetro modelo *Guava EasyCyte 8HT* (GuavaTechnologies, Hayward, CA, USA) com o *software Guava CytoSoft 4.2.1*, sendo possível detectar e identificar o tipo de morte celular.

4.7.6. MICROSCOPIA CONFOCAL

Para análise de Microscopia Confocal, foram plaqueadas 3×10^4 células/poço em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro previamente esterilizadas. As células então foram então incubadas por 24h e em seguida foram incubadas pelo período de 3h com as formulações vazias e contendo QZ. Na sequência as células foram lavadas três vezes com solução estéril de PBS (1x) e fixadas com solução de paraformaldeído a 2% em PBS (1x) durante 20 minutos. Subsequentemente, as células foram lavadas cinco vezes com PBS (1x) contendo glicina 100 mM (Sigma-Aldrich) e permeabilizadas com Triton X-100 a 0,1% (Sigma-Aldrich) diluída em PBS (1x) durante 10 minutos à temperatura ambiente. As células foram então lavadas duas vezes com PBS (1x) e incubadas com o marcador Alexa Fluor 488 (*Life Technologies*) na diluição de 1:20 em PBS (1x) durante 15 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas três vezes com PBS (1x), e montada em lâminas de vidro, utilizando 10 μL do reagente *ProLong[®] Diamond Mounting Medium with DAPI* (Life Technologies).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. NANOPARTICULAS POLIMÉRICAS – ESTUDO DA SÍNTESE

Para a preparação das nanopartículas a técnica de polimerização vem sendo amplamente utilizada, a principal vantagem desta técnica consiste na redução da necessidade de uso de reagentes e no volume reduzido de solvente orgânico, já que apenas o polímero é solubilizado em solvente adequado e, pode-se ter maior controle do tamanho da partícula, permitindo adicionar várias etapas para ajustar a melhor composição de polímeros e demais aditivos, obtendo maior rendimento e homogeneidade de partículas formadas, fácil execução e custo de produção acessível (RAO; GECKELER, 2011). O tamanho das nanopartículas pode ser controlado por alguns parâmetros, como a taxa de agitação, tipo e quantidade do agente de dispersão, viscosidade das fases orgânica e aquosa, concentração de polímero no solvente orgânico e a temperatura (TRIERWEILER, 2009). Desta forma a mais rápida e simples caracterização foi por espectroscopia de correlação de fótons. Primeiramente determinou-se o tamanho da pré-formulação desenvolvida, em torno de 200 nm, a nanoemulsão base (amostras 1 e 2) padronizadas por PRIMO em (2009), com algumas adaptações de síntese, obteve-se índices de polidispersão abaixo de 0,3, correspondendo a formulações homogêneas, além disso, as nanoemulsões possuem potenciais Zeta de -50 e -60 mV, garantindo a estabilidade coloidal (valores $> |30|$ mV), pode-se observar um leve aumento no tamanho médio e PDI da formulação de NE/QZ em relação a NE Vazia, esse aumento no diâmetro médio e no PDI pode indicar o aumento de massa devido a influência da adição do corante (DAS et al., 2011).

Em seguida determinaram-se os mesmos parâmetros para amostra 3, que continha, além dos excipientes da emulsão comum, o Concentrado de Proteínas de Leite. Foi então efetuada a emulsão usando a técnica *layer-by-layer emulsion*, onde despejou-se o conteúdo da emulsão, na solução de proteínas, onde foi observado o aumento do diâmetro hidrodinâmico médio, como esperado, entretanto, a emulsão contendo CPSL não passou pelo processo de atomização, tendo assim a possibilidade de formação de agregados maior.

Para as amostras 4 e 5, definidas como padrão de síntese deste trabalho, após o *Spray Dryer*, se mantiveram estáveis, sem grandes mudanças de tamanho e carga durante o tempo, expectativa alcançada pela remoção total da água, e solvente, pelo método.

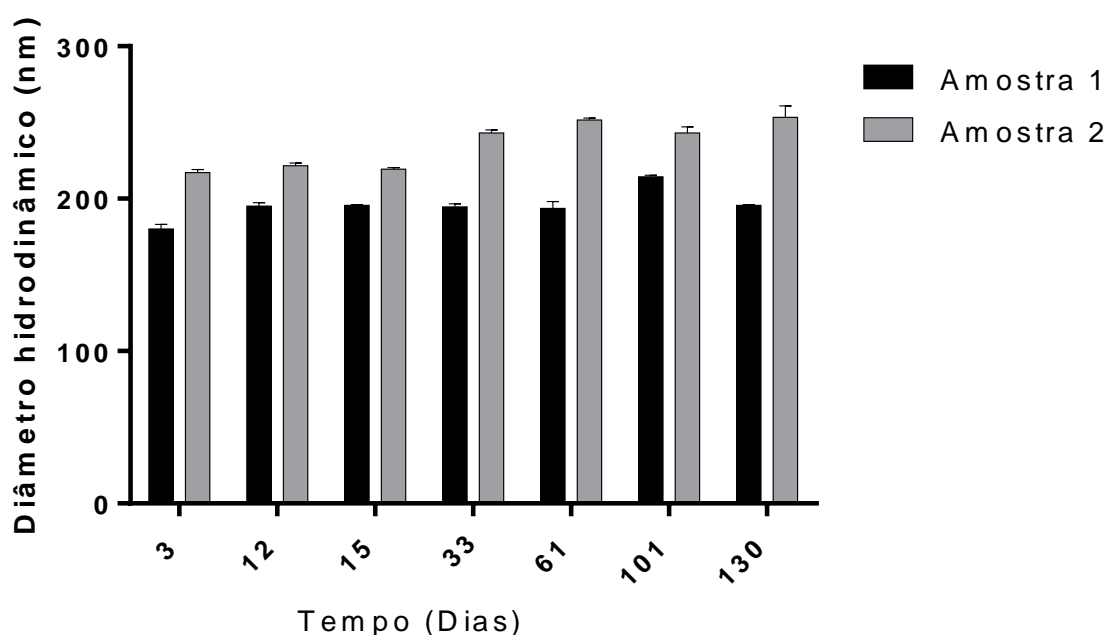
Na amostra 6 efetuou-se diferentes testes para avaliar se a alteração do parâmetro (temperatura) nos diferentes componentes da formulação, produziram formulações com melhores estabilidades, tamanhos ou homogeneidade. Entretanto, o aumento da temperatura influenciou negativamente as nanopartículas produzidas neste estudo, o aumento da temperatura no CPSL levou a produção de partículas maiores, e menos homogêneas, o aumento da temperatura do PMMA levou a formação de grumos durante a síntese, e durante a aspersão, não sendo viável. Sendo assim, o estudo inicial das nanopartículas em temperatura ambiente de adição foi levado como rota final, e replicado para testes biológicos. O diâmetro médio das nanopartículas contendo CPSL e PMMA foi próximo, já o índice de polidispersão foi levemente elevado, mas esperado, após os vários processos para produção das nanopartículas, o potencial Zeta de ambas partículas são bem próximos sem efeito direto da encapsulação do ativo, apesar das nanopartículas possuírem as cargas próximas de -30 mV, o que está no limite da estabilidade coloidal, as nanopartículas de CPSL contêm uma grande quantidade de proteínas, contribuindo também para estabilidade estérica das nanopartículas, o que aumenta a estabilidade em relação ao tempo de acompanhamento.

5.1.1. ESTABILIDADE FÍSICO-QUÍMICA

A estabilidade termodinâmica é um fator chave no desenvolvimento de um sistema de liberação de fármacos. Ao se trabalhar com veículos coloidais é imprescindível a avaliação de sua estabilidade físico-química levando em consideração a interação química do sistema fármaco/veículo e as possíveis alterações resultantes de aditivos externos a formulação, em função do tempo de estocagem em condições apropriadas. O monitoramento da estabilidade físico-química das formulações foi avaliado utilizando-se o tamanho de partículas, potencial Zeta e polidispersividade das formulações “Vazia” e contendo Quinizarina com estocagem à 4 °C (para as emulsões) e a temperatura ambiente para as nanopartículas. O tamanho da partícula, o potencial Zeta, a quantidade de fármaco são, geralmente, os parâmetros físico-químicos que podem ser utilizados para monitorar a estabilidade das partículas poliméricas. Os fosfolipídios, o tensoativo e as proteínas constituintes das nanopartículas são os principais componentes presentes nas formulações capazes de influenciar o potencial Zeta. valor de potencial Zeta relativamente alto acima de -50 mV é importante para uma boa estabilidade físico-química das nanopartículas, pois grandes forças repulsivas tendem a evitar a agregação das nanopartículas

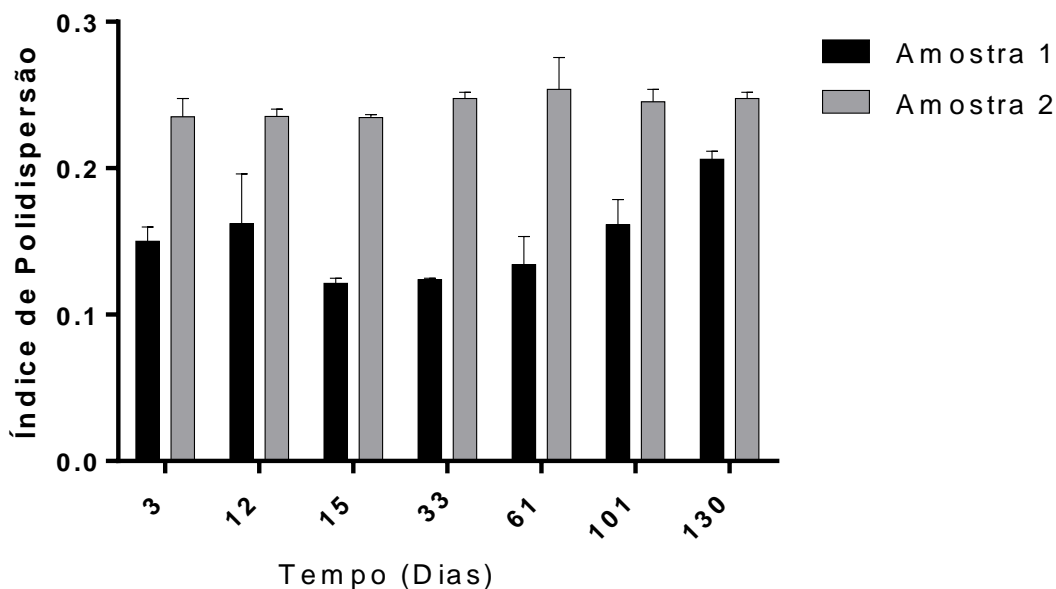
adjacentes. (SCHAFFAZICK, et al., 2003), este valor fica dentro da janela de estabilidade clássica dos sistemas coloidais, de 30 mV positivo ou negativo, devido as repulsões, entretanto, conforme já mencionado as nanopartículas também possuem uma grande quantidade de proteínas que contribuem para estabilidade estérica. A significância estatística das diferenças em relação ao tempo inicial foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (* $p < 0,05$). As Figuras de 9 a 11 mostram o estudo de estabilidade avaliando os diâmetros hidrodinâmico de partículas, índice de polidispersividade das formulações em função do tempo. Observa-se nas Figuras 9 e 10, que o diâmetro das amostras se manteve inferior a 300 nm, com o seu índice de polidispersividade abaixo de 0,30 demonstrando que as partículas se mantiveram estáveis tanto para amostra vazia quanto para a contendo QZ.

Figura 9 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 10 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão (PDI) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.

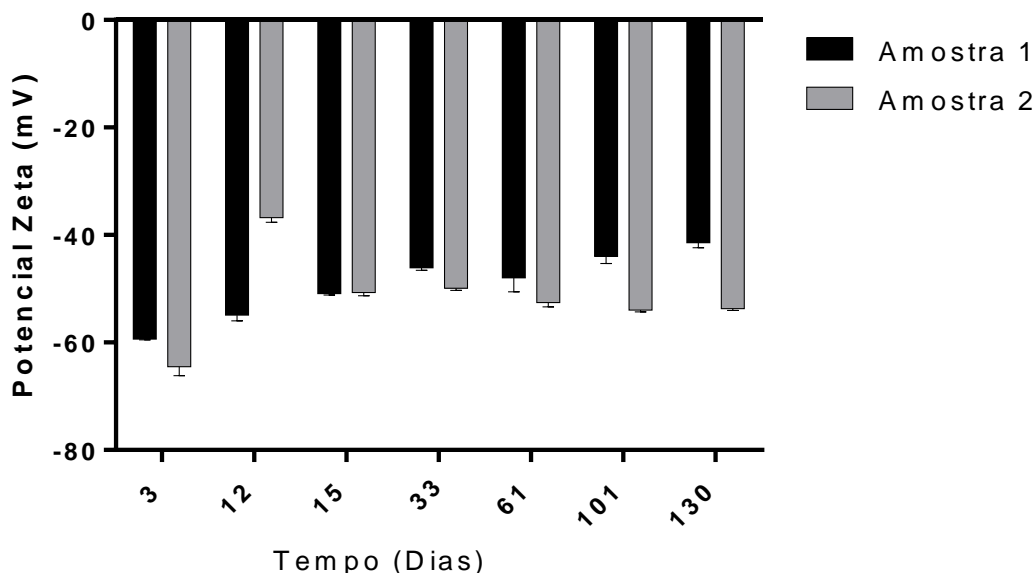


Fonte: elaborada pela Autora.

O potencial Zeta reflete o potencial de superfície das partículas, ele pode ser influenciado pelas mudanças na interface com o meio dispersante, em razão da dissociação de grupos funcionais na superfície da partícula ou da adsorção de espécies iônicas presentes no meio aquoso de dispersão. Esta análise nos permite determinar a estabilidade da interação que a partícula possa ter com o fármaco (TAVARES, 2011).

Na Figura 11 a seguir, foi demonstrado o estudo de estabilidade avaliando-se o potencial Zeta das formulações NE/Vazia e NE/Quinizarina em função do tempo, observou-se que a variação média entre as medidas foi de 10 mV, sendo uma variação aceitável para sistemas manométricos coloidais.

Figura 11 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

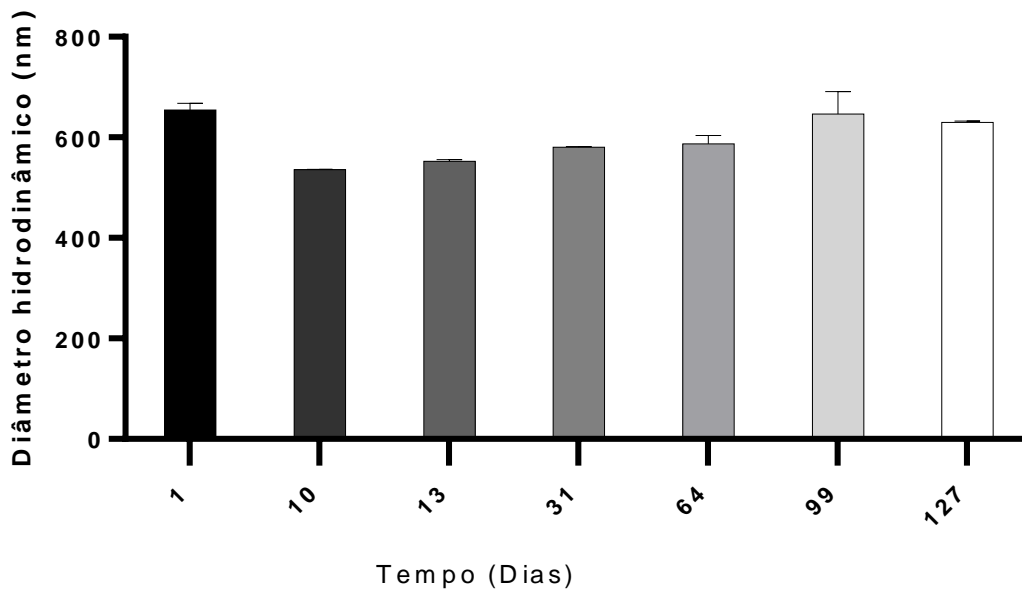
Observa-se que uma emulsão de quinizarina, pode ser preparada com sucesso, gerando partículas com tamanho sub-micrométrico, adequado para sistemas celulares, com índices de polidispersão abaixo de 0,3 e potenciais zeta da ordem de -50 mV, demonstrando assim um sistema nanométrico de alta estabilidade coloidal.

Além disso, a preparação com CPSL e PMMA em meio líquido foi avaliada em relação ao tempo. Esta preparação foi feita seguindo os preceitos de uma emulsão camada por camada “layer-by-layer” e foi utilizada para efeitos de comparação com a estabilidade da nanopartícula de mesma quantidade de material.

As Figuras de 12 a 14 mostram o estudo de estabilidade avaliando os diâmetros hidrodinâmico de partículas, índice de polidispersividade das formulações em função do tempo.

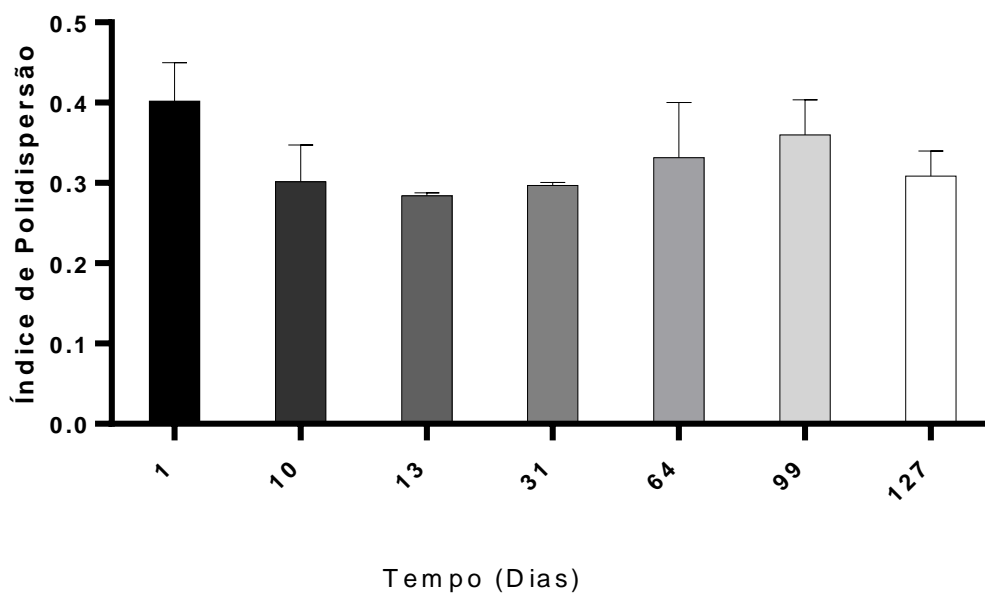
Observa-se nas Figura 12 e 13, que o diâmetro das amostras se manteve próximos a 600 nm, durante todas as medidas e o seu índice de polidispersividade entre 0,3 e 0,4 demonstrando que as partículas se mantiveram relativamente estáveis, porém claramente maiores e mais polidispersas que nanoemulsão que não continha o recobrimento/interação com CPSL, demonstrando assim o efeito da adição destes componentes na emulsão pela técnica camada por camada.

Figura 12 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanoemulsão contendo Quinizarina e CPSL em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

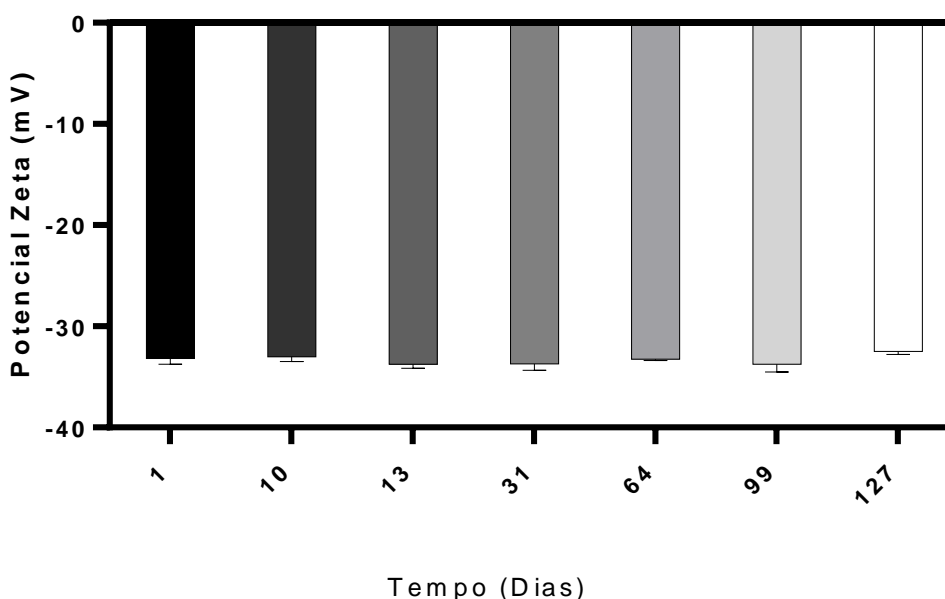
Figura 13- Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanoemulsão contendo Quinizarina e CPSL em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

Na Figura 14 a seguir, foi demonstrado o estudo de estabilidade avaliando-se o potencial Zeta da nanoemulsão de Quinizarina contendo CPSL, em função do tempo, observou-se que a variação do potencial foi praticamente nula durante o período avaliado.

Figura 14 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão contendo Quinizarina, CPSL e PMMA em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

Observa-se que a emulsão de quinizarina obtida com a técnica camada por camada adicionando-se CPSL, foi preparada com sucesso. Entretanto gerou partículas com tamanhos não adequados para uso em sistemas celulares (> 500 nm), com índices de polidispersão abaixo de 0,4 (relativamente altos), mas com potenciais zeta aceitáveis, na ordem de -30 mV, demonstrando assim um sistema de razoável estabilidade coloidal.

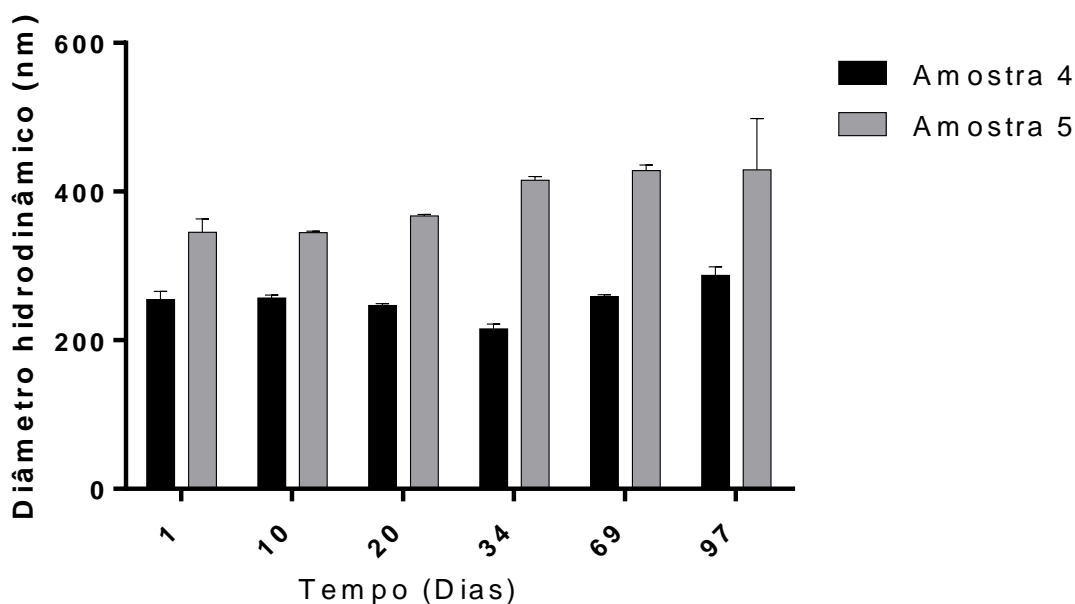
Após a adição de polímeros na produção de nanopartículas e posterior atomização via *Nano Spray Dyer* também foi realizado o acompanhamento da estabilidade, sendo elas armazenadas a temperatura ambiente e em forma de pó. Para análise em DLS, foi utilizada uma massa de 0,50 mg da formulação, diluídas em 2,0 mL de água *Milli-Q* somente no momento da leitura de cada amostra.

As Figuras de 15 a 17 mostram o estudo de estabilidade avaliando os diâmetros hidrodinâmico de partículas, índice de polidispersividade das formulações em função do tempo. A significância estatística das diferenças em relação ao tempo inicial foi determinada pelo teste

de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).

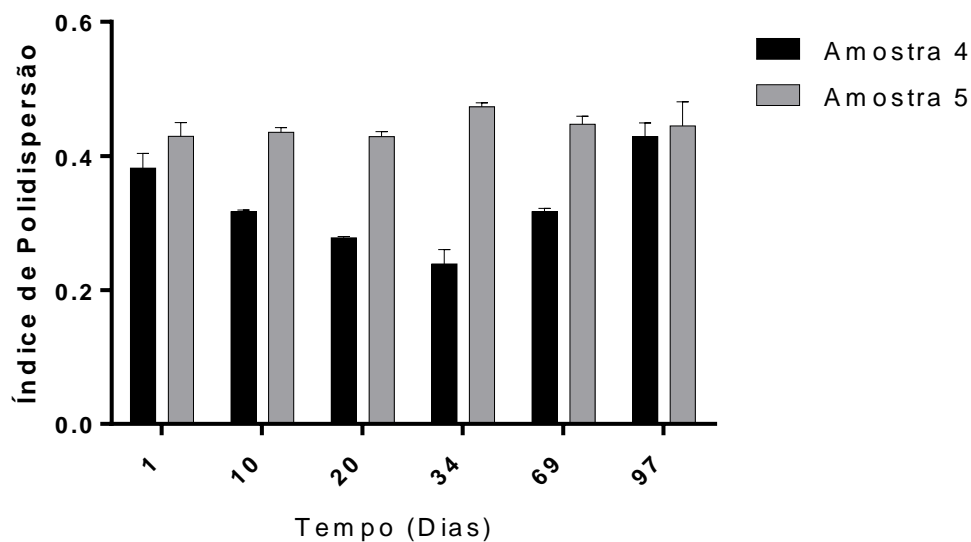
Observa-se nas Figuras 15 e 16, que o diâmetro das amostras se manteve inferior a 400 nm, uma redução aproximada de 200 nm em relação a amostra 3, contendo os mesmos excipientes e ativo, entretanto sem o uso do *Nano Spray Dryer*. O seu índice de polidispersividade foi mantido próximos de 0,4 demonstrando que as partículas se mantiveram relativamente estáveis tanto para amostra vazia quanto para a contendo QZ.

Figura 15 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanopartícula Vazia (5) e contendo Quinizarina (4) em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

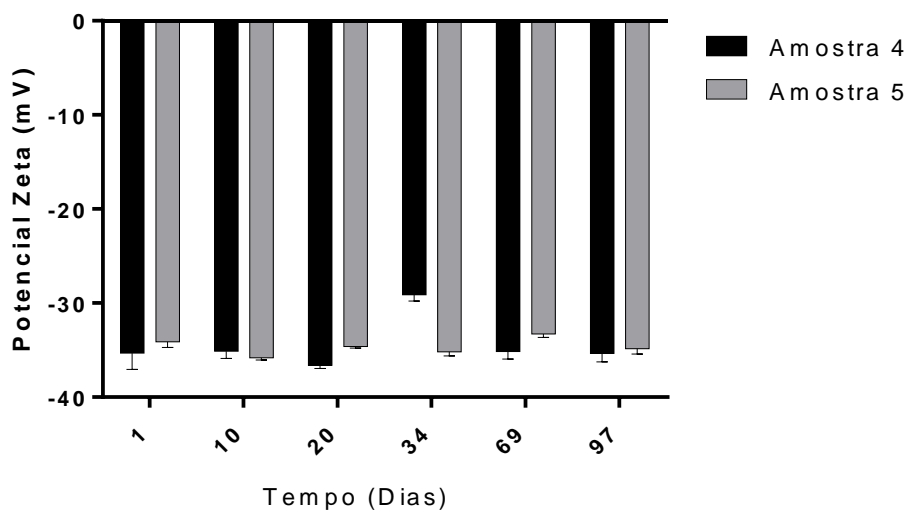
Figura 16 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanopartícula Vazia (5) e contendo Quinizarina (4) em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

Na Figura 17 a seguir, foi demonstrado o estudo de estabilidade avaliando-se o potencial Zeta das formulações NP/Vazia e NP/Quinizarina em função do tempo.

Figura 17 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão Vazia (5) e contendo Quinizarina (4) em relação ao tempo.



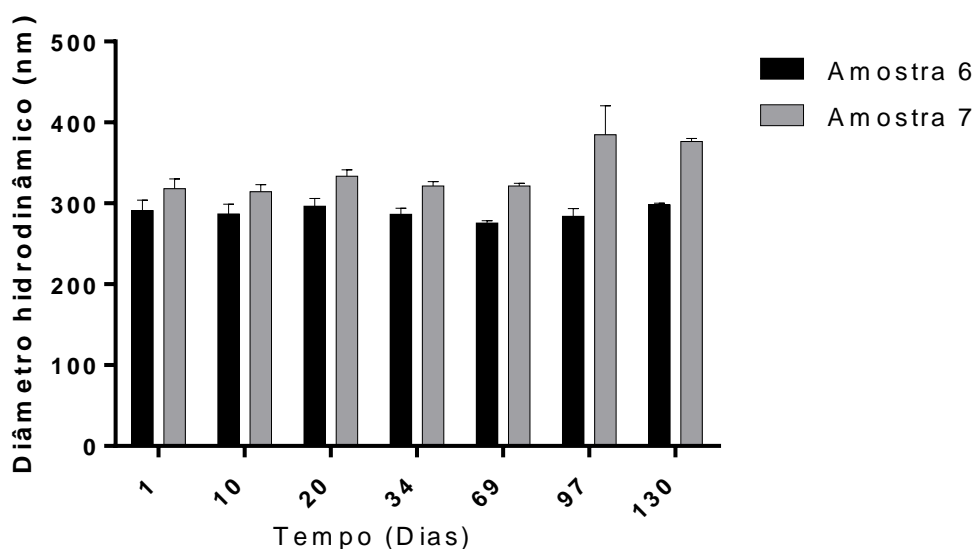
Fonte: elaborada pela Autora.

Observa-se que a naonemulsão de quinizarina, pode ser preparada com sucesso, gerando partículas com tamanho sub-micrométrico (< 400 nm), adequado para sistemas celulares, com índices de polidispersão próximos de 0,4 e potenciais Zeta da ordem de -35 mV, demonstrando assim um sistema manométrico de alta estabilidade coloidal mesmo após submetida ao processo de secagem pelo o sistema *Nano Spray Dryer*.

As Figuras de 18 a 20, abaixo, mostram o estudo de estabilidade avaliando os diâmetros hidrodinâmico de partículas, índice de polidispersividade das formulações em função do tempo, para as amostras 6 e 7. A significância estatística das diferenças em relação ao tempo inicial foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações ($*p < 0,05$).

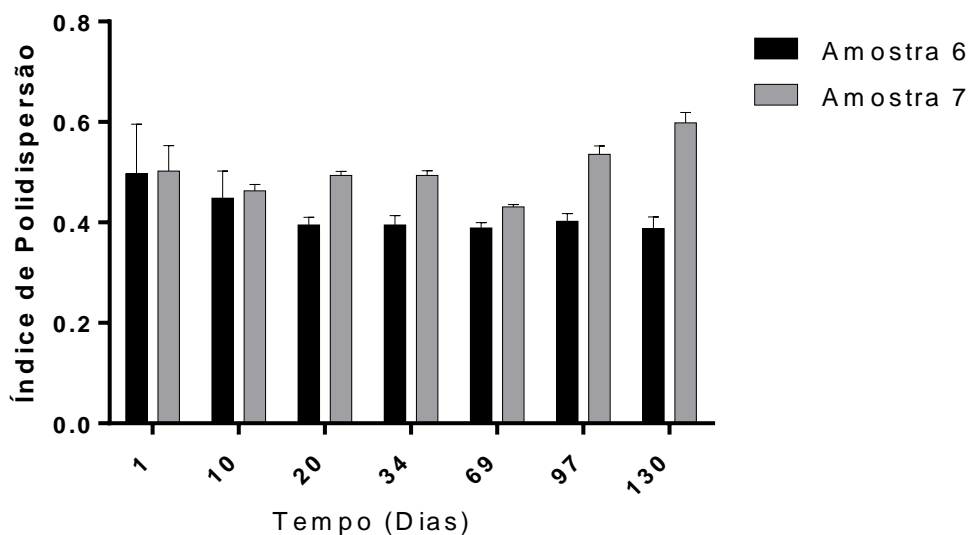
Observa-se nas Figuras 17 e 18, que o diâmetro hidrodinâmico das amostras se manteve inferior a 400 nm, próximos aos valores da amostra 5, entretanto seu índice de polidispersividade apresentou variações na ordem de 0,5 a 0,6, indicando heterogeneidade e possível instabilidade das partículas pelo período de tempo analisado.

Figura 18 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanopartícula Quinizarina (6) e contendo Nanopartícula Vazia (7) em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

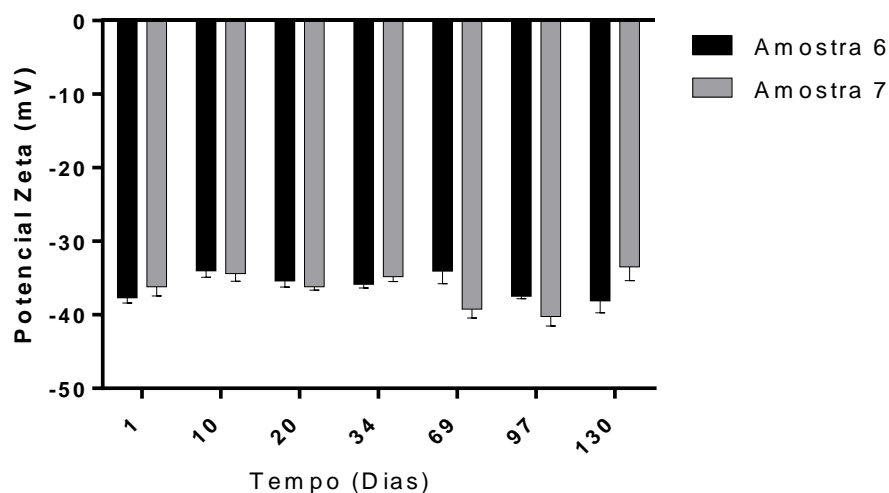
Figura 19 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanopartícula Quinizarina (6) e contendo Nanopartícula Vazia (6) em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

Na Figura 20 a seguir, foi demonstrado o estudo de estabilidade avaliando-se o potencial Zeta das formulações NP/Vazia e NP/Quinizarina em função do tempo.

Figura 20 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanopartícula de Quinizarina (6) e Nanoemulsão Vazia (7) em relação ao tempo.



Fonte: elaborada pela Autora.

Observa-se que as nanopartículas preparadas com as variações de temperatura de 50 a 55 °C, apresentaram índices de polidispersão próximos de 0,6 e potenciais Zeta da ordem de -35mV. Sendo assim, esta variação de temperatura afetou negativamente as nanopartículas, sendo assim descartadas para uso em sistema biológico, devido parâmetros físico-químicos não adequados.

Neste estudo de estabilidade foi mostrado que as preparações iniciais de nanoemulsões se demonstraram estáveis sendo armazenadas em temperatura de 4°C e que após a adição das misturas de polímeros CPSL/PMMA observa-se que estas tiveram um aumento no seu diâmetro médio e no índice de polidispersividade, mas que não houve mudanças muito significativas na estabilidade das mesmas, nas partículas alvo, sendo possível concluir que durante o período analisado a formulação de interesse se manteve estável. Também se observa que com adição das proteínas e polímero, teve-se uma diminuição do potencial Zeta, porém o armazenamento das nanopartículas em pó, na temperatura ambiente pode contribuir positivamente para que sua estabilidade seja maior do que as nanoemulsões, além da presença das proteínas ligadas ao sistema.

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos (diâmetro, índice de polidispersividade e potencial zeta) das diferentes amostras sintetizadas

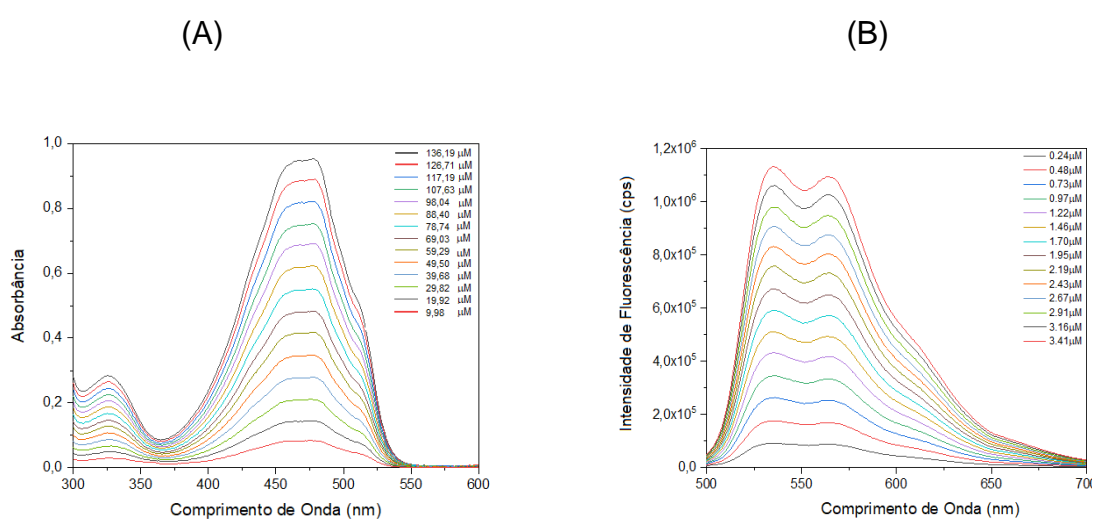
AMOSTRA	FORMULAÇÃO	DIÂMETRO MÉDIO (nm)	PDI	POTENCIAL ZETA
AMOSTRA 1	NE-V	189 ($\pm 1,0$)	0,17 ($\pm 0,01$)	-50,2 ($\pm 1,0$)
AMOSTRA 2	NE-QZ	217 ($\pm 2,0$)	0,24 ($\pm 0,01$)	-64,5 ($\pm 3,0$)
AMOSTRA 3	NE-QZ	654 ($\pm 13,0$)	0,40 ($\pm 0,05$)	-33,2 ($\pm 1,0$)
AMOSTRA 4	NP-QZ	255 ($\pm 11,0$)	0,38 ($\pm 0,02$)	-35,3 ($\pm 1,0$)
AMOSTRA 5	NP-V	345 ($\pm 18,0$)	0,43 ($\pm 0,02$)	-34,1 ($\pm 1,0$)
AMOSTRA 6	NP-QZ	291 ($\pm 13,0$)	0,50 ($\pm 0,05$)	-37,4 ($\pm 1,0$)
AMOSTRA 7	NP-V	310 ($\pm 12,0$)	0,53 ($\pm 0,05$)	-38,5 ($\pm 1,0$)

5.2. ESPECTROSCOPIA DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV-VISÍVEL

A linearidade de um método analítico é capacidade de se obter resultados experimentais diretamente proporcionais a concentração do analito, para assim foram obtidos os espectros de

absorção e de fluorescência, vistos na Figura 21. Para se obter os resultados de regressão linear, e a curva padrão de calibração, construiu-se um gráfico de absorbância ou intensidade de fluorescência *versus* concentração de QZ em $\mu\text{mol/L}$, como observado na Figura 22 (A e B). Estas curvas padrão de calibração (linearidade) foram utilizadas como método espectro-analítico para posterior determinação da encapsulação do princípio ativo nas nanopartículas.

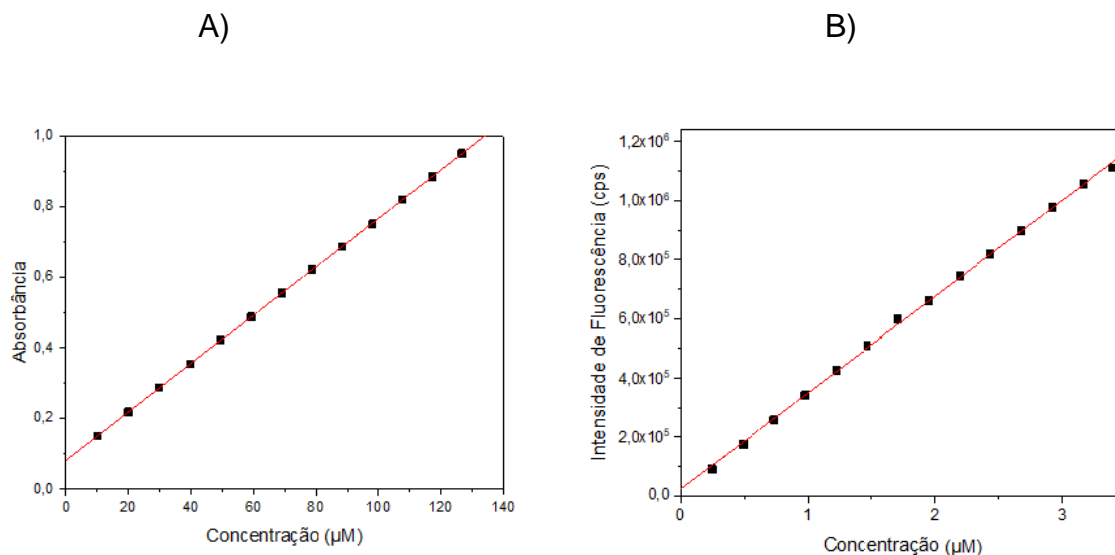
Figura 21 - Espectros de absorção (A) e emissão (B) de QZ em diferentes concentrações em acetonitrila de grau espectroscópico.



Fonte: elaborada pela Autora

O espectro de absorção da QZ apresenta uma banda principal na região do visível (400 – 550 nm). A QZ em acetonitrila apresenta seu conjunto de bandas características, e o comprimento de onda de absorção máximo foi de 480 nm (Figura 21 A), e para espectroscopia de emissão de fluorescência, obteve-se o espectro, também característico, a partir do comprimento de onda de excitação em 470 nm, resultando no máximo de emissão de fluorescência em 575 nm (Figura 21 B).

Figura 22 - Curva padrão analítica de Quinizarina em acetonitrila (A) absorvância versus concentração ($y = 0,08072 + 0,00686x$, $R^2 = 0,99998$) e (B) intensidade de fluorescência versus concentração ($y = 32593982973x + 23483,1885$, $R^2 = 0,99917$).



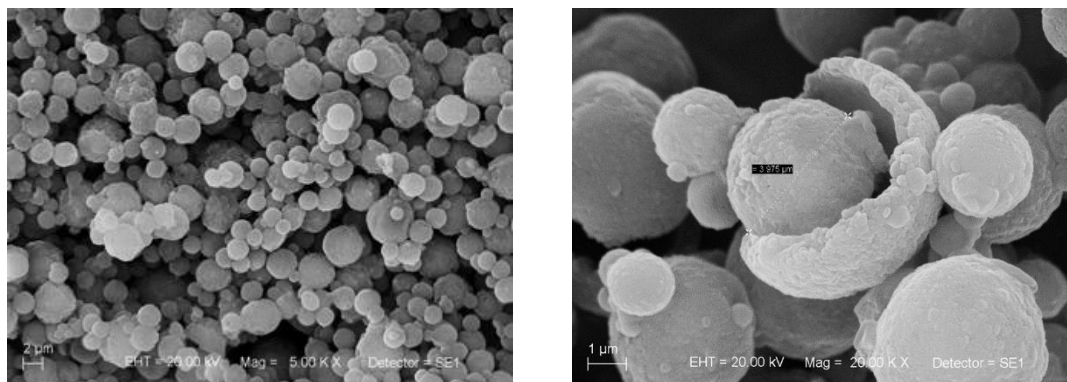
Fonte: elaborada pela Autora.

As análises de regressão linear foram realizadas com sucesso, com coeficientes lineares de $R^2 = 0,99998$ e $R^2 = 0,99917$, para absorvância e intensidade de fluorescência, respectivamente, indicando um ajuste adequado para utilização das linearidades como métodos espectro-analíticos para o ativo QZ no presente estudo.

5.3. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA – MEV

Com o objetivo de avaliar morfologicamente as partículas obtidas nestes ensaios, as amostras foram analisadas pela técnica de Microscopia Eletrônica de Varredura. Esta técnica é uma importante ferramenta utilizada na estratégia para caracterização de nanomateriais dos mais diferentes tipos e classes, e que se pode comparar com os resultados de espectroscopia de correlação de fótons. Foi possível observar que as nanopartículas estão em formatos aglomeradas após aspersão no *Spray Dryer*, e após solubilização em meio aquoso voltam a se desagregar, verificando tamanhos na região nanométrica. Os resultados das nanopartículas vazias são apresentados na Figura 23, na qual observa-se que as partículas formadas possuem uma morfologia esférica e com faixa de tamanho ampla, de 100 nm a 10 µm.

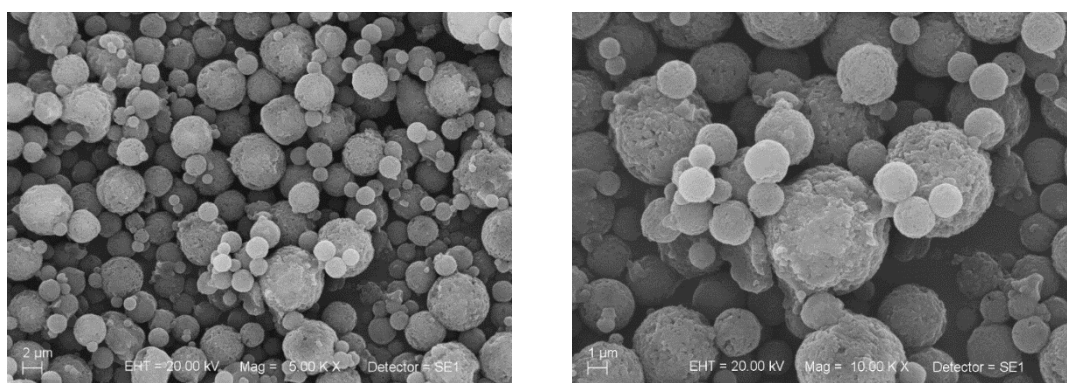
Figura 23 - MEV da amostra de NP “Vazia”. Magnitude – 5,0 Kx, EHT = 20 Kv (A) e Magnitude -20 Kx, EHT= 20 Kv (B).



Fonte: elaborada pela Autora.

De forma geral foram obtidas nanopartículas de PMMA e CPSL estáveis e, a partir das imagens obtidas por MEV, foi possível determinar sua morfologia como esperada, sendo estas esféricas e com distribuição de tamanhos relativamente acima das partículas não recobertas de acordo com os estudos de LI, *et al.*, (2010). Quando se adiciona o corante QZ, há uma manutenção destas características, como visto na Figura 24. As nanopartículas obtidas estão dentro dos parâmetros esperados de acordo levando em consideração com os resultados obtidos por LI, *et al.*, (2010)

Figura 24 - MEV da amostra de NP de Quinizarina. Magnitude – 5,0 Kx, EHT = 20 Kv (A) e Magnitude -10 Kx, EHT= 20 Kv (B).



Fonte: elaborada pela Autora.

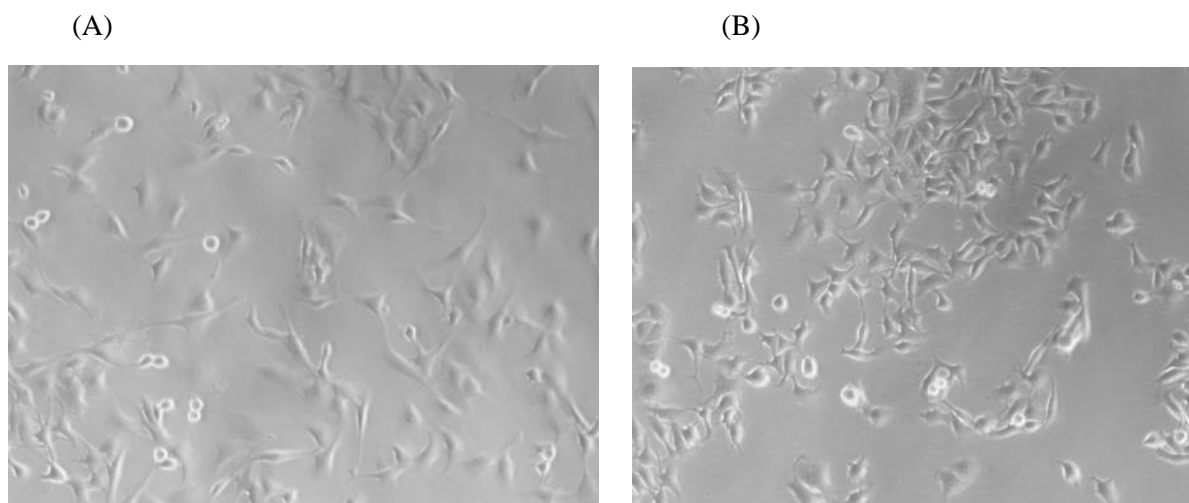
Na intenção de avaliar morfologicamente as partículas obtidas pela técnica de atomização pelo *Nano Spray Dryer*, observa-se que as partículas contendo QZ possuem uma morfologia esférica não uniforme com uma ampla faixa de tamanho diferentes dos tamanhos médios obtidos por DLS, o que pode ser justificado pelas nanopartículas estarem em formatos aglomeradas após aspersão no *Nano Spray Dryer*, e após solubilização em meio aquoso voltam a se desagregar. Os dados de DLS são independentes visto que se baseiam análise do equilíbrio coloidal das partículas, as quais estão solvatadas por moléculas de água, e assim altera-se seu tamanho resultante no diâmetro hidrodinâmico.

5.4. CULTURA CELULAR

5.4.1. EXPANSÃO E CULTURA

Para o desenvolvimento deste estudo, foram efetuados testes de biocompatibilidade celular, para determinar uma possível citotoxicidade do sistema nanoparticulado. Foi escolhido uma linhagem fibroblastóide NIH-3T3 (Figura 25A) para os testes iniciais de biocompatibilidade devido seu papel tradicional como modelo padrão para citotoxicidade de materiais. Além disso, as nanopartículas alvo deste trabalho foram avaliadas quanto a citotoxicidade em um sistema melanocítico B16-F10 focando na patologia do melanoma (Figura 25 B).

Figura 25 – (A) Linhagem fibroblastóide NIH-3T3 e (B) linhagem melanocítica B16-F10, ambas comerciais obtidas da ATCC.



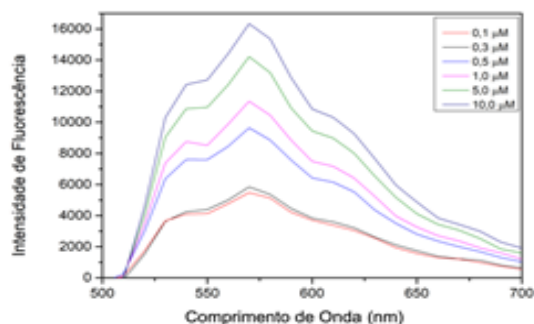
Fonte: elaborada pela Autora.

5.4.2. ESTUDO DE INTERNALIZAÇÃO

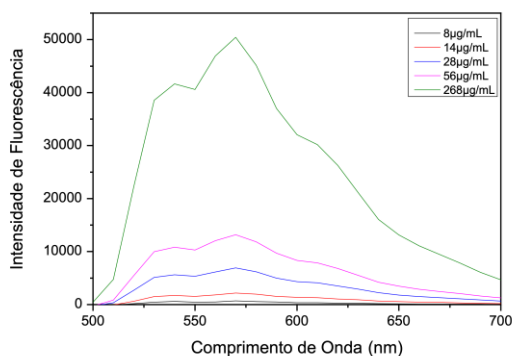
A fim de se determinar a internalização (*uptake*) das nanopartículas pelas células, foi feito um estudo de internalização por meio de emissão de fluorescência intercelular, sem *lise*. Com estes estudos foi possível comprovar a presença da Quinizarina internalizada nas células e estas apresentaram maior emissão de fluorescência que as células tratadas com as mesmas concentrações de ativo livre em DMSO, como visto na Figura 26. Os ensaios foram realizados para a linhagem fibroblastóide NIH-3T3, em seguida foi efetuado o mesmo estudo com a linhagem B16-F10, como apresentado na Figura 27.

Figura 26 - Espectros de emissão da Quinizarina (A) livre em DMSO, e nanoparticulada (B) em diferentes concentrações na linhagem NIH-3T3, após 3h de internalização, seguida de lavagem com PBS, obtidos em meio de cultura DMEM sem a presença do indicador vermelho de fenol.

(A)

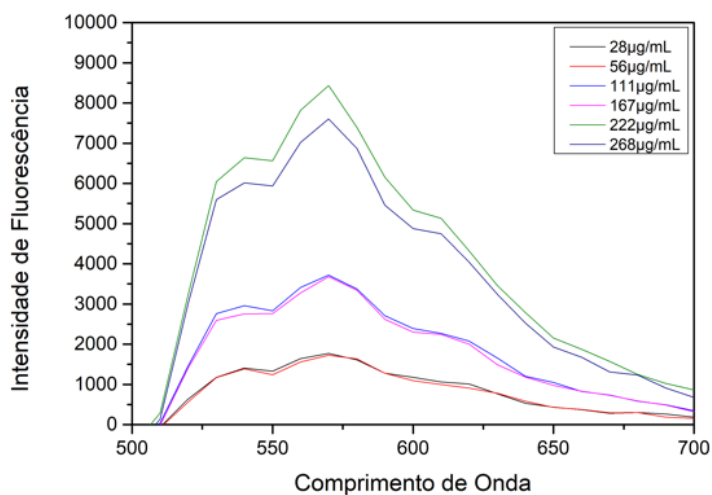


(B)



Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 27 - Espectros de emissão da QZ nanoparticulada em diferentes concentrações na linhagem B16-F10, após 3h de internalização, seguida de lavagem com PBS, obtidos em meio de cultura RPMI-1640 sem a presença do indicador vermelho de fenol.



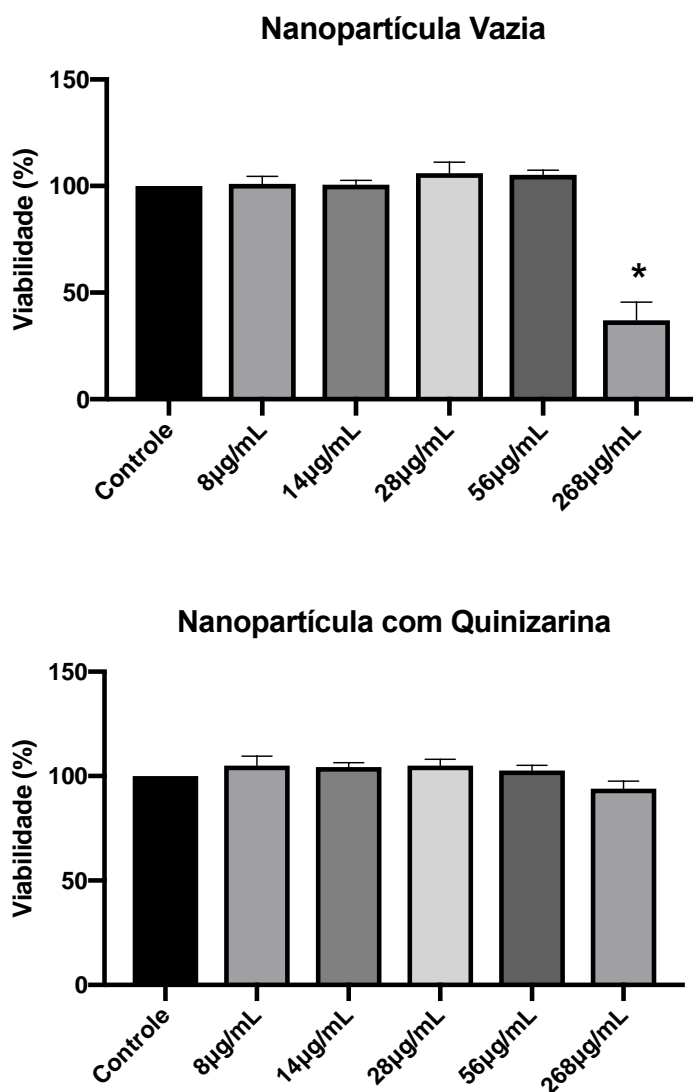
Fonte: elaborada pela Autora.

5.4.3. CITOTOXICIDADE DAS NPS EM CONDIÇÃO DE ESCURO E FOTOTOXICIDADE DAS NPS

Inicialmente realizou-se concentrações e 8,0 µg/mL a 286 µg/mL de nanopartículas em linhagem de fibroblástóides NIH-3T3, onde foi verificada a ausência toxicidade das nanopartículas em meio biológico. O teste de viabilidade celular de MTT, foi utilizado como teste básico para determinação da citotoxicidade, tanto no escuro, como visto na Figura 28.

O teste colorimétrico empregado para avaliar a viabilidade celular também chamado MTT, avalia-se a atividade metabólica da célula. Somente células viáveis e com metabolismo ativo, pela atividade das enzimas mitocondriais, conseguem metabolizar o formazam, quando este é solubilizado, forma-se uma coloração roxa na qual pode-se realizar medidas de absorbância (PRÄBST, et al.,2017).

Figura 28 - Ensaio de Viabilidade por MTT, da célula fibroblastóides de camundongo (NIH-3T3) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de escuro, com concentrações de 8,0 $\mu\text{g/mL}$ a 286 $\mu\text{g/mL}$. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).

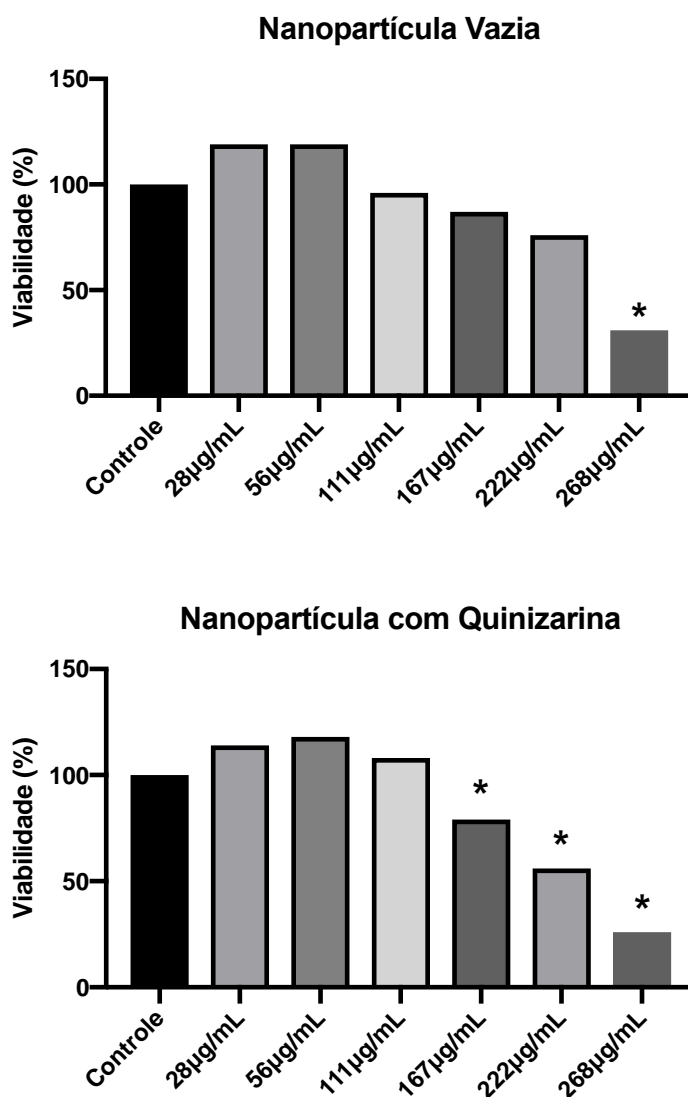


Fonte: elaborada pela Autora.

Na Figura 28 pode-se observar que para a concentração de 268 $\mu\text{g/mL}$ houve toxicidade da nanopartículas “vazia”. Entretanto, as concentrações de 111 e 222 $\mu\text{g/mL}$, corroboraram com estudos recentes onde foi verificado efeito anti-neoplásico na presença de derivados de antraquinonas (LIU et al., 2019). Desta maneira optou-se por realizar os estudos com LED nestas concentrações visto que no estudo no escuro não houver toxicidade.

Para a linhagem celular melanocítica B16-F10 (Figura 29), foi utilizada para determinação de morte celular com o uso sinérgico da QZ combinada com fotoativação com LED azul, e da QZ na ausência de luz, sendo possível observar menor viabilidade celular com resultado de efeito terapêutico complementar devido o uso da TFD.

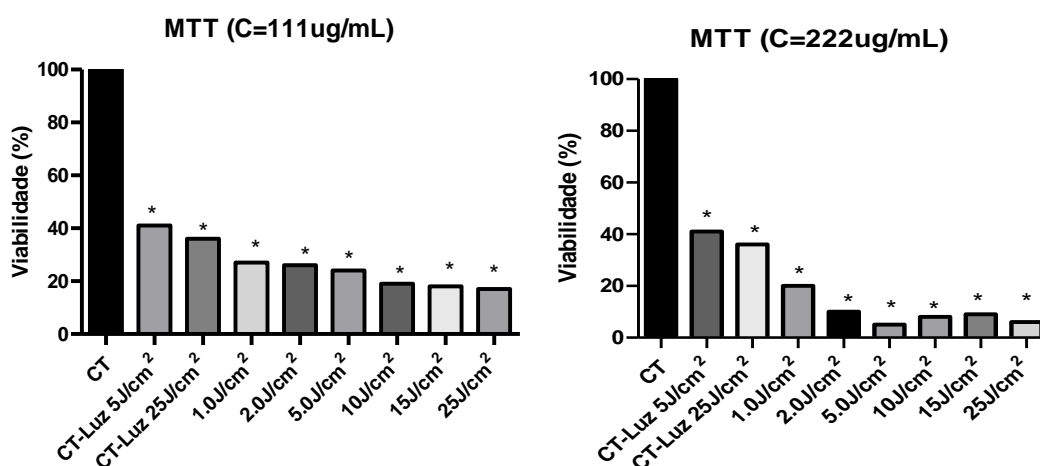
Figura 29 - Ensaio de Viabilidade por MTT, da linhagem celular melanocítica (B16-F10) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de escuro, com concentrações de 28 $\mu\text{g/mL}$ a 268 $\mu\text{g/mL}$. (A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste Tukey t-test para múltiplas comparações (* $p < 0,05$)).



Fonte: elaborada pela Autora.

No estudo de viabilidade na presença de luz, foram utilizadas duas concentrações, de: 111 $\mu\text{g/mL}$ e 222 $\mu\text{g/mL}$. Escolheu-se a primeira pois não demonstrava efeito tóxico sob as células melanocíticas na ausência de luz, e a segunda para avaliação do efeito sinérgico da Quinizarina sob a linhagem celular. Para efeito de comparação foram utilizados controles negativos (ausência de luz) e controle do LED (presença de luz e ausência de fármaco), conforme visto na Figura 30.

Figura 30 - Ensaios de Viabilidade por MTT, da linhagem celular melanocítica (B16-F10) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm^2 , com concentrações de 111 $\mu\text{g/mL}$ e 222 $\mu\text{g/mL}$.



Fonte: elaborada pela Autora.

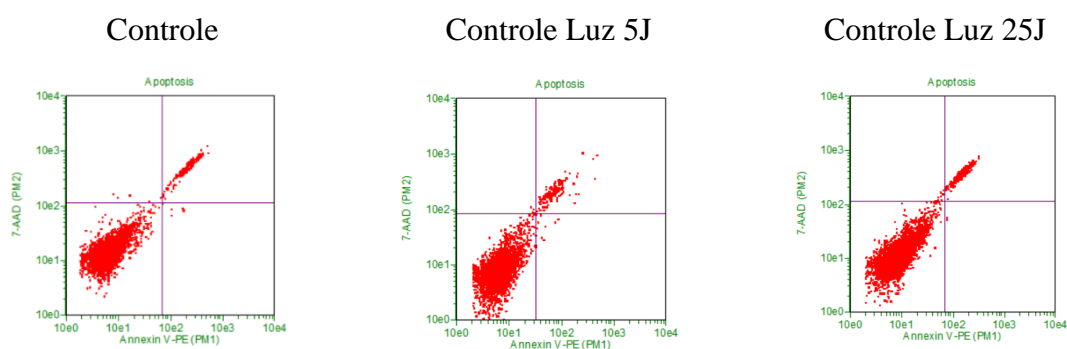
Foi possível observar o efeito fotodinâmico após o tratamento em diferentes concentrações de 111 e 222 $\mu\text{g/mL}$ de Nanopartículas de Quinizarina e diferentes fluências de luz LED. Quanto maior a concentrações de QZ e maior fluências de luz LED maior a indução de morte celular em relação ao controle apresentando diferença estatística.

5.4.4. CITOMETRIA DE FLUXO

Foi realizada a técnica de Citometria de Fluxo para avaliação dos processos biológicos que ocorreram após o tratamento fotodinâmico com duas diferentes concentrações de Nanopartículas poliméricas de Quinizarina de 111 e 222 $\mu\text{g/mL}$ em conjunto com diferentes doses de LED.

Para avaliação de qual a via de morte celular foi desencadeada utilizou-se o *Kit Guava Nexin* (Merck Milipore), que consiste em duas análises por Anexina V e por 7AAD. A anexina V é uma proteína de ligação de fosfolípidios dependentes de cálcio e com alta afinidade pela fosfatidilserina (PS) um componente da membrana normalmente localizado no lado interno da membrana celular. No início da via apoptótica, as moléculas de PS são translocadas para a superfície externa da membrana celular, onde a anexina V pode facilmente se ligar a elas, quando há externalização da fosfatidilserina (PS) há ligação da anexina V ao PS exposto sugerindo uma via de morte apoptótica. Já o 7AAD é uma marcador que tem propriedades de se inserir entre as bases nitrogenadas Citosina-Guanina da dupla fita do DNA. Quando há alterações de permeabilidade da membrana celular normalmente observadas em morte celular necrótica, o 7-AAD torna-se permeável se ligando ao DNA que está acessível no interior da célula. Sendo assim, foi possível determinar: (i) células viáveis (não apoptóticas) quando a resposta é negativa para ambos os reagentes, ou seja, anexina V (-) e 7-AAD (-), (ii) células em apoptose precoce, anexina V (+) e 7-AAD (-) e (iii) apoptose tardia e necrose, anexina (+) e 7-AAD (+) (ABRAHAMSEN et.al, 2002; CROWLEY et.al, 2016).

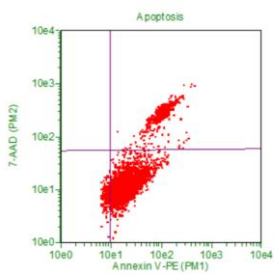
Figura 31 – *DotPlot* da linhagem B16-F10, tratadas em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm².



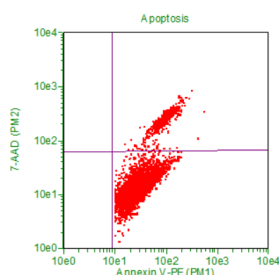
Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 32 – *DotPlot* da linhagem B16-F10, tratadas com nanopartículas de QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm², com concentrações de C1= 111 µg/mL.

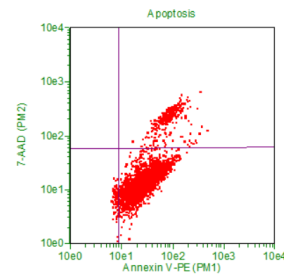
1.0 J/cm² C=111 µg/mL



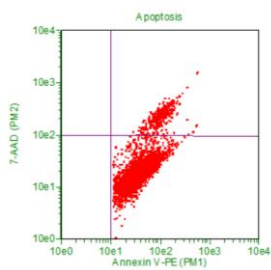
2.0 J/cm² C=111 µg/mL



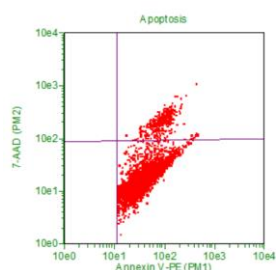
5.0 J/cm² C=111 µg/mL



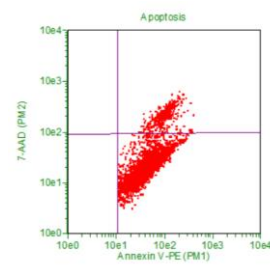
10 J/cm² C=111 µg/mL



15 J/cm² C=111 µg/mL



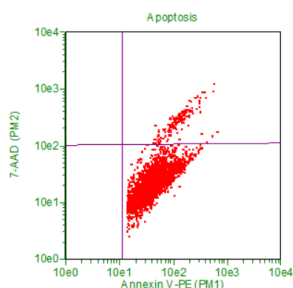
25 J/cm² C=111 µg/mL



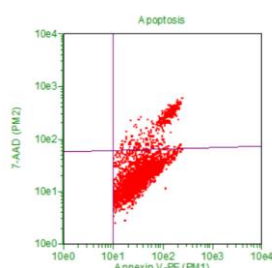
Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 33 – *DotPlot* da linhagem B16-F10, tratadas com nanopartículas de QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm², com concentrações de C1= 222 µg/mL

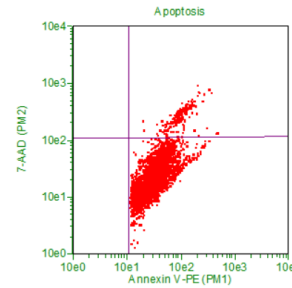
1.0 J/cm² C=222 µg/mL



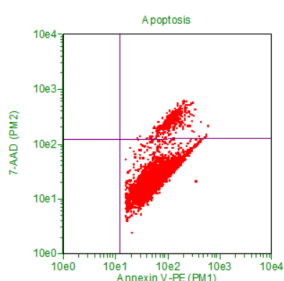
2.0 J/cm² C=222 µg/mL



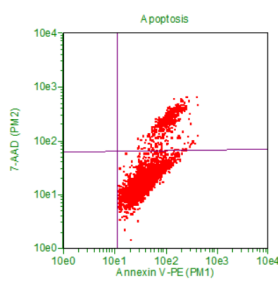
5.0 J/cm² C=222 µg/mL



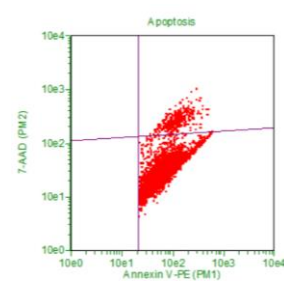
10 J/cm² C=222 µg/mL



15 J/cm² C=222 µg/mL



25 J/cm² C=222 µg/mL



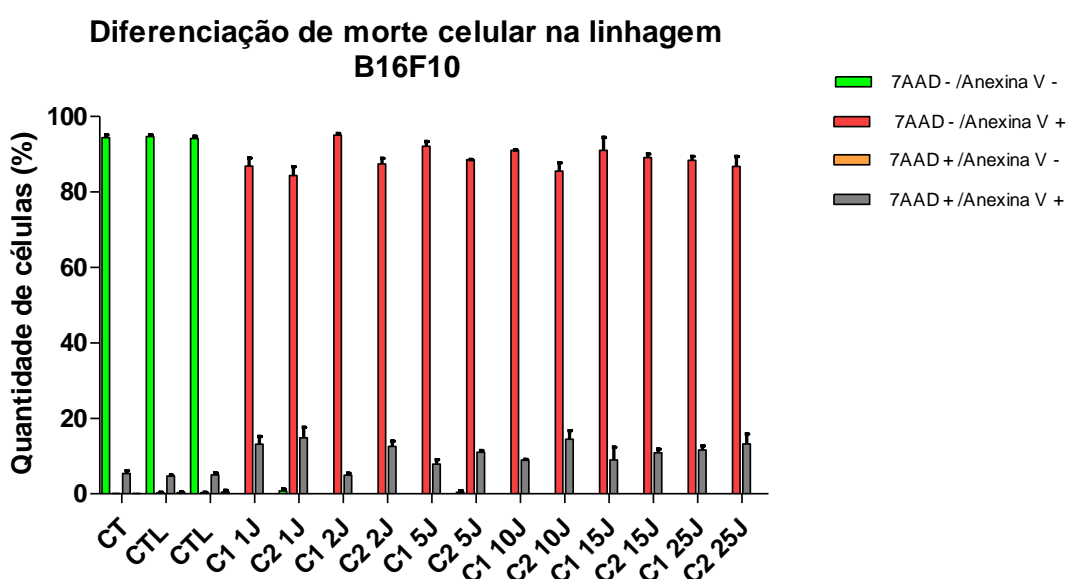
Fonte: elaborada pela Autora.

Os dados brutos obtidos pelo Citômetro, são demonstrados nas Figuras 31,32 e 33, onde após a análise no software do equipamento, foi possível obter as viabilidades, que são vistas abaixo no histograma da Figura 34. Pode-se observar que no controle e controle de Luz do LED nas duas fluências as células se concentram no quadrante inferior esquerdo indicando que as células estão viáveis. Já as células das duas concentrações de 111 e 222 µg/mL de Nanopartículas de Quinizarina e nas diferentes fluências de luz LED se concentraram no quadrante inferior e superior do lado direito demonstrando que a via de morte celular desencadeada pelo tratamento fotodinâmico foi apoptótico. Em alguns estudos do Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina de Ribeirão Preto foi demonstrado que as terapias Fotodinâmicas realizadas, desencadearam a via de morte apoptótica como visto neste estudo (FRANCHI, et al. 2016; DAVANZO, et al.,2017; CANDIDO, et al., 2018).

A necrose é um tipo de morte celular causada por indutores de estresse não fisiológicos as células podendo causar ruptura da membrana e extravasamento de organelas celulares

liberando conteúdos tóxicos que podem causar processos inflamatórios posteriores. Já a apoptose é um tipo de morte celular onde há várias alterações morfológicas características na estrutura da célula dependentes de enzimas, onde ocorre uma morte limpa, levando a mínimos danos aos tecidos circundantes e livres de processos infecciosos. (CHEN, et al., 2018)

Figura 34 - Ensaios de Viabilidade por citometria de fluxo, para determinação da via de morte celular, da linhagem celular melanocítica (B16-F10) incubada com as nanopartículas na ausência e na presença da QZ em condição de luz, utilizando fluências de 1,0 a 25 J/cm², com concentrações de C1= 111 µg/mL e C2 = 222 µg/mL.



Fonte: elaborada pela Autora.

Este ensaio biológico, diferente do MTT, é baseado na utilização do *KIT Guava Nexin* (Merck Millipore). A marcação com Anexina é um dos testes mais utilizados para avaliar mecanismo de morte celular, por apoptose ou necrose. Entretanto, observou-se diferentes viabilidades em comparação com o MTT, isto pode ser devido a uma emissão basal das nanopartículas nos canais de emissão do citômetro de fluxo *Guava Easy Cyte 8HT*, como este equipamento é um modelo básico convencional, não é possível determinar se a viabilidade é real ou apenas aumentada em relação a emissão das nanopartículas.

5.4.5. MICROSCOPIA CONFOCAL

Nos estudos de microscopia confocal, foi possível observar diferentes perfis de internalização das nanopartículas pelas linhagens celulares fibroblastóide (Figura 35) e melanocítica (Figura 36).

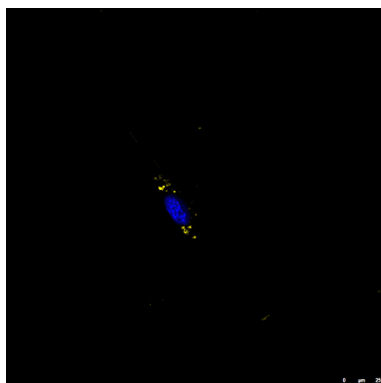
Nos estudos de microscopia foi utilizado dois marcadores celulares, o DAP que é um marcador fluorescente que se liga fortemente as regiões de Adenina-Timina no DNA sendo possível visualizar o núcleo celular (KARG., 2018). Já a Faloidina tem alta afinidade e capacidade de se ligar na actina filamentosa, estes filamentos se localizam no citoplasma da célula (NATARAJAN, et al., 2018). A quinizarina apresenta características espectroscópicas próprias sendo possível a sua visualização na microscopia confocal e a partir da marcação tanto do núcleo e citoplasma foi possível identificar o local de internalização das nanopartículas contendo Quinizarina.

Na linhagem fibroblastóide a região com marcação pelas nanopartículas pode ser determinada como peri-nuclear, podendo corresponder região onde se encontra a organela de síntese e transporte de várias substâncias, o retículo endoplasmático. Entretanto na linhagem melanocítica B16-F10, a internalização do corante se deu na totalidade da célula, altamente concentrada no núcleo mas também no citoplasma, optou-se então para esta determinação, a utilização do método “Z-Stack” no microscópio confocal, em que consiste obter imagens de diferentes planos focais, e efetuar o empilhamento digital para formação de uma imagem tridimensional (3D).

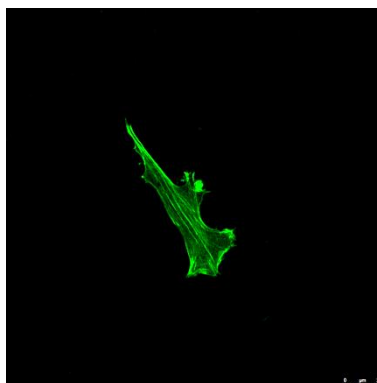
Figura 35 - Microscopia confocal demonstrando a internalização do corante fotossensibilizador (QZ). Na linhagem celular NIH-3T3, após 3h de incubação com QZ/NP e realizou-se 24 h após o tratamento, em azul o DAPI – marcação nuclear, em amarelo a Quinizarina e em verde o Alexa Fluor 488 – marcação com faloidina dos filamentos de actina.

Linhagem NIH-3T3

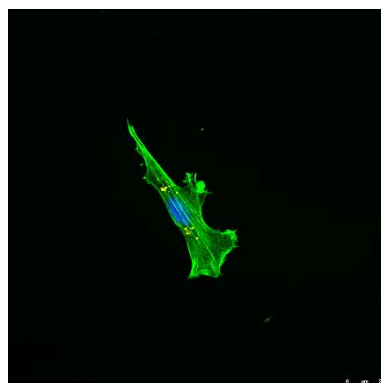
DAPI e Quinizarina



Faloidina



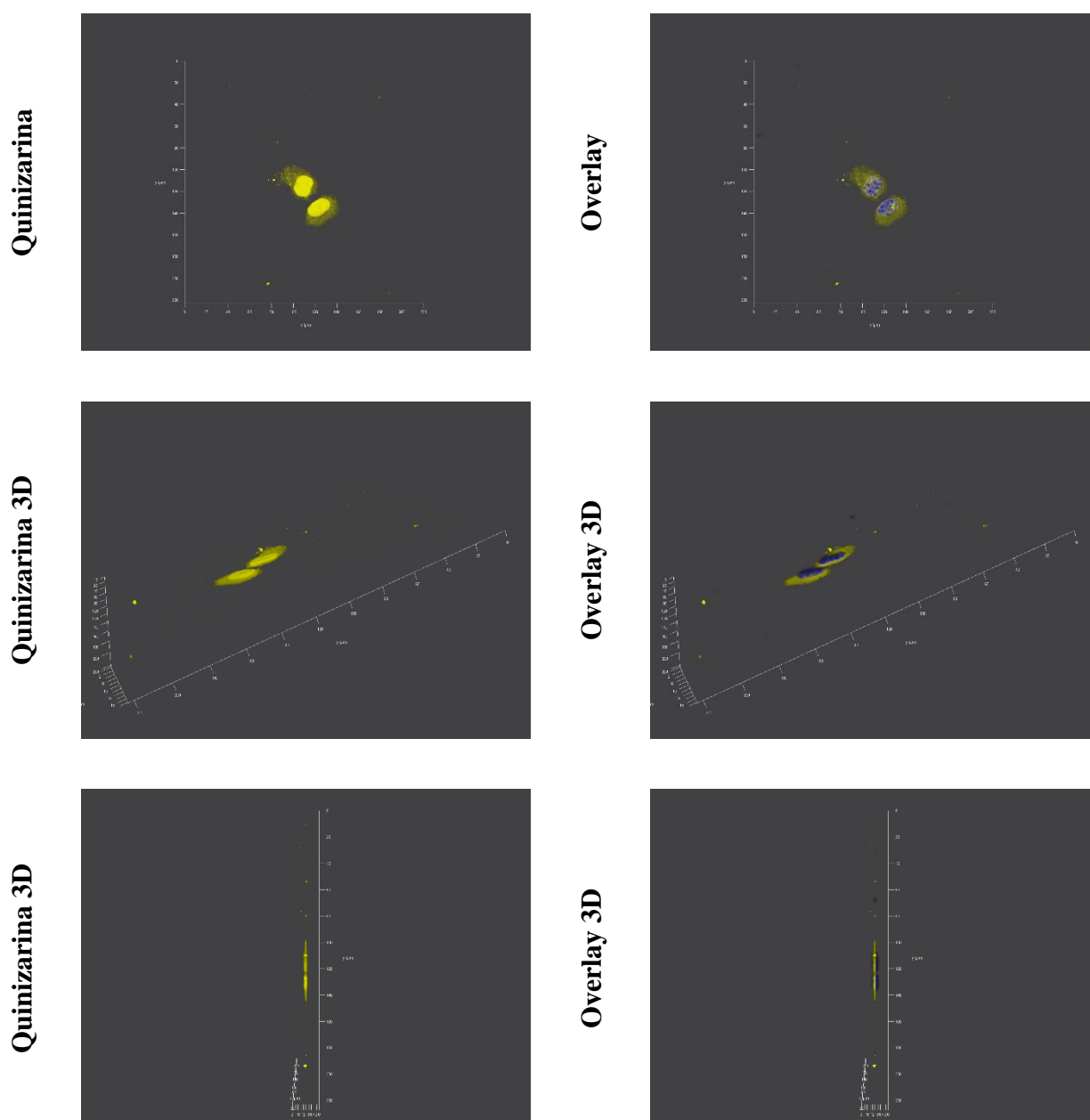
Overlay



Fonte: elaborada pela Autora.

Figura 36 - Microscopia confocal demonstrando a internalização do corante fotossensibilizador (QZ). Na linhagem celular B16-F10, após 24h de incubação com QZ/NP, em azul o DAPI – marcação nuclear, em amarelo a Quinizarina, com a utilização do método “Z-Stack”.

Linhagem B16-F10



Fonte: elaborada pela Autora.

Como foi possível observar na linhagem melanocítica B16-F10, a internalização da Quinizarina se deu na totalidade da célula, concentrando na região do núcleo, mas também no citoplasma, como visto no método “Z-Stack” no microscópio confocal. Estes resultados foram

inovadores, pois não havia dados sobre este corante/ fármaco fotossensibilizador como marcadores celulares descritos na literatura até o presente momento.

6. CONCLUSÃO

Neste trabalho foi plenamente possível desenvolver nanopartículas com a utilização de uma pré-formulação de nanoemulsão, seguindo-se com aplicação da técnica de polimerização que foi dividida em três etapas. A técnica de atomização pelo *Nano Spray Dryer* se demonstrou muito eficiente e ofereceu vantagens visando o escalonamento industrial, com rápida obtenção das nanopartículas recobertas com CPSL/PMMA e contendo o corante inovador QZ.

O tamanho das nanopartículas poliméricas adquiridas se mantiveram abaixo e 300 nm o que é ideal para materiais poliméricos. Os índices de polidispersividade ficaram abaixo de 0,3 demonstrando uma boa homogeneidade na distribuição de tamanhos e o potencial Zeta em -30 mV verificando que as formulações se mantiveram estáveis durante os 130 dias de acompanhamento utilizando a técnica de espectroscopia de correlação de fótons (DSL-*Dynamic Light Scattering*).

Obteve-se imagens por MEV (Microscopia eletrônica de varredura) onde foi possível ver o recobrimento das nanopartículas com CPSL/PMMA, formando morfologia esféricas e com uma ampla faixa de tamanhos.

Quanto ao método espectro-analítico proposto foi obtido com sucesso, a partir das curvas padrão analítica de quantificação pelas análises espectroscópicas, por absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis. Foi possível quantificar o ativo encapsulado na formulação, obtendo-se mais que 70% de rendimento após atomização em *Nano Spray Dryer*.

No teste de internalização (uptake) em células sadias fibroblastóide e cancerígena melanômica foi possível observar que a Nanopartícula polimérica contendo Quinizarina teve uma maior internalização pelas células quanto comparado com a Quinizarina livre. Demonstrando que as nanopartículas contendo os polímeros CPSL/PMMA tiveram alta biocompatibilidade celular.

Além disso, nos testes biológicos foi observada uma baixa toxicidade da nanopartículas vazia, e toxicidade das nanopartículas contendo ativo, corroborando com dados da literatura devido possível atividade biológica do corante (anti-neoplásica), em estudos com luz (LED) foi possível obter viabilidade de 5%, com efeito fotodinâmico esperado. Nos ensaios biológicos complementares em citometria por *Anexina* os mesmos perfis de viabilidade celular não foram

possíveis de serem confirmados devido a emissão basal das nanopartículas nos canais do citômetro utilizado.

Dentre as principais vantagens deste sistema nanoestruturado, as partículas produzidas têm um baixo custo de produção, resultaram maior eficiência de internalização do princípio ativo nanoveiculado em relação ao livre. Além disso observou-se claramente um efeito sinérgico na aplicação do LED azul e da concentração de 222 µg/mL de QZ na linhagem de B16-F10.

Com todos estes resultados, temos que a viabilidade comparada com o controle de ativo livre (QZ em DMSO não citotóxico) demonstrou viabilidade maior que o que o nanoparticulado sendo mais eficiente. Além disso observamos que a utilização da TFD foi efetiva, e o efeito da QZ e da produção das espécies reativas foram efetivas induzindo o efeito de morte celular, confirmando a inovação tecnológica esperada uma vez que a QZ ainda é uma molécula pouco explorada no contexto terapêutico e de TFD.

Portanto este trabalho pode dar início a estudos *in vivo* propondo ensaios clínicos futuros com QZ nanoestruturada, dando possibilidades para tratamentos de câncer de pele. Como perspectivas futuras, maiores estudos devem ser executados a fim de se determinar os fatores que levam a morte celular das células incubadas com Quinizarina para confirmar seu mecanismo de atuação anti-tumoral, e determinação para utilização em testes *in-vivo*.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINIS, Patrizia *et al.* Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**. v. 61, n. 4, p. 250-281, 2011.
- ALMEIDA, VL de *et al.* Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**. v. 28, n. 1, p. 118-29, 2005.
- ANDSOY, Isil Isik *et al.* What Turkish nurses know and do about skin cancer and sun protective behavior. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**. v. 14, n. 12, p. 7663-7668, 2013.
- BABA, Koichi; NISHIDA, Kohji. Steroid nanocrystals prepared using the Nano Spray Dryer B-90. **Pharmaceutics**. v. 5, n. 1, p. 107-114, 2013.
- BARBUGLI, Paula A *et al.* In vitro phototoxicity of liposomes and nanocapsules containing chloroaluminum phthalocyanine on human melanoma cell line. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**. v. 10, n. 1, p. 569-573, 2010.
- BARENHOLZ, Yechezkel Chezy. Doxil®—the first FDA-approved nano-drug: lessons learned. **Journal of Controlled Release**. v. 160, n. 2, p. 117-134, 2012.
- BARIL, MB *et al.* Nanotecnologia aplicada aos cosméticos. **Visão Acadêmica**. v. 13, n. 1, 2012.
- BECHET, Denise *et al.* Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends in biotechnology**. v. 26, n. 11, p. 612-621, 2008.
- BÜRKI, K *et al.* New insights into respirable protein powder preparation using a nano spray dryer. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 408, n. 1-2, p. 248-256, 2011.
- CALIXTO, Giovana *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**. v. 21, n. 3, p. 342, 2016.
- CANDIDO, Natalia Maria *et al.* Combining photodynamic therapy and chemotherapy: improving breast cancer treatment with nanotechnology. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 14, n. 5, p. 994-1008, 2018.
- CASTANO, Ana P; DEMIDOVA, Tatiana N; HAMBLIN, Michael R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 1, n. 4, p. 279-293, 2004.
- ÇELİK, Sevim; İLÇE, Arzu; ANDSOY, Işıl Işık. Knowledge and protective behaviors about skin cancer among nursing students in the west Black Sea region of Turkey. **Journal of Cancer Education**. v. 33, n. 4, p. 885-892, 2018.

CERIZE, Natália Neto Pereira. **Estudo de sistemas nanocarreadores para o ácido 5-aminolevulínico com aplicação na terapia fotodinâmica**. 2012. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) Universidade de São Paulo, 2012.

CHEN, Qi; KANG, Jian; FU, Caiyun. The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 3, n. 1, p. 18, 2018.

CROWLEY, L. C.; MARFELL, B. J.; SCOTT, A. P.; WATERHOUSE, N. J. Quantitation of apoptosis and necrosis by annexin V binding, propidium iodide uptake, and flow cytometry. **Cold Spring Harbor Protocols**, n.11, 2016. DOI: 10.1101/pdb.prot087288.

DAVANZO, Nathalia Nossi et al. Light source is critical to induce glioblastoma cell death by photodynamic therapy using chloro-aluminiumphthalocyanine albumin-based nanoparticles. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 19, p. 181-183, 2017.

DAS, Surajit *et al.* Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 88, n. 1, p. 483-489, 2011.

DAUDT, Renata M *et al.* A nanotecnologia como estratégia para o desenvolvimento de cosméticos. **Ciência e Cultura**. v. 65, n. 3, p. 28-31, 2013.

DAVIS, Mark E; CHEN, Zhuo; SHIN, Dong M. Nanoparticle therapeutics: an emerging treatment modality for cancer. *In*: RODGERS, P. (Ed.). **Nanoscience And Technology: A Collection of Reviews from Nature Journals**. London: World Scientific, 2010. p. 239-250.

DE PAULA, LB *et al.* Evaluation of a chloroaluminium phthalocyanine-loaded magnetic nanoemulsion as a drug delivery device to treat glioblastoma using hyperthermia and photodynamic therapy. **RSC Advances**. v. 7, n. 15, p. 9115-9122, 2017.

DOLLENDORF, Christian *et al.* Polymerization of novel methacrylated anthraquinone dyes. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**. v. 9, n. 1, p. 453-459, 2013.

DUVAL, Johanna *et al.* Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: A review. **Industrial Crops and Products**. v. 94, p. 812-833, 2016.

EZHILARASI, PN *et al.* Nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. **Food and Bioprocess Technology**. v. 6, n. 3, p. 628-647, 2013.

FEUSER, Paulo Emilio *et al.* Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly (methyl methacrylate) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **European Polymer Journal**. v. 68, p. 355-365, 2015.

FOUILLAUD, Mireille *et al.* **Anthraquinones**. Boca Raton, Fl.: CRC Press 2018.

FRANCHI, Leonardo Pereira et al. In vitro effects of photodynamic therapy induced by chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 16, p. 100-105, 2016.

FREIXO, Luís Carlos Araújo. **Micro e nanoencapsulação como estratégias de estabilização de entidades bioativas**. 2013. 76 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Universidade Fernando Pessoa, Porto, Portugal. 2013.

HAYNES, William M. (Ed.). **CRC handbook of chemistry and physics**. 95th. ed. Boca Raton, Fl.: CRC Press, 2014.

HENG, Desmond *et al.* The nano spray dryer B-90. **Expert Opinion on Drug Delivery**. v. 8, n. 7, p. 965-972, 2011.

HONG, Eun Ji; CHOI, Dae Gun; SHIM, Min Suk. Targeted and effective photodynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. **Acta Pharmaceutica Sinica B**. v. 6, n. 4, p. 297-307, 2016.

HORA, C *et al.* Avaliação do conhecimento quanto a prevenção do câncer da pele e sua relação com exposição solar em frequentadores de academia de ginástica. **An Bras Dermatol**. v. 78, n. 6, p. 693-701, 2003.

HSIAO, Yu-Cheng *et al.* Evaluating the sensitizing effect on the photocatalytic decoloration of dyes using anatase-TiO₂. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 148, p. 250-257, 2014.

JACK, Angela *et al.* The treatment of melanoma with an emphasis on immunotherapeutic strategies. **Surgical Oncology**. v. 15, n. 1, p. 13-24, 2006.

JUNGHANNS, Jens-Uwe AH; MÜLLER, Rainer H. Nanocrystal technology, drug delivery and clinical applications. **International Journal of Nanomedicine**. v. 3, n. 3, p. 295, 2008.

KATALINIC, Alexander *et al.* Does skin cancer screening save lives? An observational study comparing trends in melanoma mortality in regions with and without screening. **Cancer**. v. 118, n. 21, p. 5395-5402, 2012.

KONAN, Yvette Niamien; GURNY, Robert; ALLÉMANN, Eric. 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.

LEE, Sie Huey *et al.* Nano spray drying: a novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. **International Journal of Pharmaceutics**. v. 403, n. 1-2, p. 192-200, 2011.

LI, Xiang *et al.* Nanoparticles by spray drying using innovative new technology: The Büchi Nano Spray Dryer B-90. **Journal of Controlled Release**. v. 147, n. 2, p. 304-310, 2010.

LIU, Yanghou *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of 1, 4-dihydroxyanthraquinone derivatives as anticancer agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 29, n. 9, p. 1120-1126, 2019.

LIU, Yujia *et al.* Temperature-dependent structure stability and in vitro release of chitosan-coated curcumin liposome. **Food Research International**. v. 74, p. 97-105, 2015.

MALIK, Enas M; MÜLLER, Christa E. Anthraquinones as pharmacological tools and drugs. **Medicinal Research Reviews**. v. 36, n. 4, p. 705-748, 2016.

MARTÍNEZ-HUITLE, Carlos A; BRILLAS, Enric. Decontamination of wastewaters containing synthetic organic dyes by electrochemical methods: a general review. **Applied Catalysis B: Environmental**. v. 87, n. 3-4, p. 105-145, 2009.

MAZUR, Federico *et al.* Liposomes and lipid bilayers in biosensors. **Advances in Colloid and Interface Science**. v. 249, p. 88-99, 2017.

MEBERT, Andrea M. *et al.* Nanoengineered silica: properties, applications and toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 753-770, 2017.

MEHRAVAR, Rabeah; JAHANSHAH, M; SAGHATOLESLAMI, Nasser. Production of biological nanoparticles from Θ -lactalbumin for drug delivery and food science application. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 24, 2009.

MONTOYA, Susana C Núñez *et al.* 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.

MOSMANN, Tim. 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.

MOURA, Marigilson Pontes de Siqueira. **Nanocarreadores contendo ftalocianina de cloroalumínio: desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação in vitro da fotocitotoxicidade em melanoma**. 2011. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2011.

MUHD JULKAPLI, Nurhidayatullaili; BAGHERI, Samira; BEE ABD HAMID, Sharifah. Recent advances in heterogeneous photocatalytic decolorization of synthetic dyes. **The Scientific World Journal**. v. 2014, Article ID 692307, 25 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/692307>

MÜLLER, Rainer H; GOHLA, Sven; KECK, Cornelia M. State of the art of nanocrystals—special features, production, nanotoxicology aspects and intracellular delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 78, n. 1, p. 1-9, 2011.

NASERI, Neda; VALIZADEH, Hadi; ZAKERI-MILANI, Parvin. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: structure, preparation and application. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. v. 5, n. 3, p. 305, 2015.

NATARAJAN, Anupama *et al.* Temporal characterization of neuronal migration behavior on chemically patterned neuronal circuits in a defined in vitro environment. **ACS Biomaterials Science & Engineering**, v. 4, n. 10, p. 3460-3470, 2018.

OBAID, Girgis *et al.* Photonanomedicine: a convergence of photodynamic therapy and nanotechnology. **Nanoscale**. v. 8, n. 25, p. 12471-12503, 2016.

PARRA, C; GONZALEZ, G; ALBANO, C. Synthesis of PMMA by high frequency ultrasound. **Microscopy and Microanalysis**. v. 11, n. S02, p. 2040-2041, 2005.

PASZKO, Edyta *et al.* Nanodrug applications in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. v. 8, n. 1, p. 14-29, 2011.

PATRA, Santanu *et al.* 2-Dimensional graphene as a route for emergence of additional dimension nanomaterials. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 89, p. 8-27, 2017.

PERKIN, William H. LXXIV. On mauveine and allied colouring matters. **Journal of the Chemical Society, Transactions**. v. 35, p. 717-732, 1879.

PLAETZER, Kristjan *et al.* Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. **Lasers in medical science**. v. 24, n. 2, p. 259-268, 2009.

PRÄBST, Konstantin *et al.* Basic colorimetric proliferation assays: MTT, WST, and resazurin. In: GILBERT, Daniel F.; FRIEDRICH, Oliver (Eds.). **Cell Viability Assays: Methods and Protocols**. New York, NY: Humana Press, 2017. p. 1-17.

PRIMO, Fernando Lucas. **Processos fotodinâmicos para bioestimulação tecidual em modelo in vitro de pele humana empregando-se laser de baixa potência e cloro alumínio ftalocianina em nanoemulsão**. 2009. Tese (Doutorado em Medicamentos e Cosméticos) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, 2009.

RANG, H.P. *et al.* (Ed.). **Rang & Dale Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier Brasil, 2015.

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

REZA MOZAFARI, M *et al.* Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. **Journal of liposome Research**. v. 18, n. 4, p. 309-327, 2008.

ROCO, Mihail C. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 14, n. 3, p. 337-346, 2003.

ROSENKRANZ, Andrey A; JANS, David A; SOBOLEV, Alexander S. Targeted intracellular delivery of photosensitizers to enhance photodynamic efficiency. **Immunology and Cell Biology**. v. 78, n. 4, p. 452-464, 2000.

SCHAFROTH, Nina *et al.* Nano and microparticle engineering of water insoluble drugs using a novel spray-drying process. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 90, p. 8-15, 2012.

SCHAMING, Delphine; REMITA, Hynd. Nanotechnology: from the ancient time to nowadays. **Foundations of Chemistry**. v. 17, n. 3, p. 187-205, 2015.

SETLIK, Jussilene; SILVA, Rodrigo Cássio. O uso da terapia fotodinâmica como tratamento alternativo para o câncer de pele do tipo não-melanoma. **Revista Saúde e Desenvolvimento**. v. 7, n. 4, p. 195-206, 2016.

SIWAK, Doris R *et al.* Curcumin-induced antiproliferative and proapoptotic effects in melanoma cells are associated with suppression of I κ B kinase and nuclear factor κ B activity and are independent of the B-Raf/mitogen-activated/extracellular signal-regulated protein kinase pathway and the Akt pathway. **Cancer**. v. 104, n. 4, p. 879-890, 2005.

TRIERWEILER, Luciane Ferreira. **Nanopartículas**: Como produzi-las em escala industrial. Tese (Doutorado em Engenharia Química) Escola de Engenharia Química, UFRGS, 2009.

WANG, Taoran *et al.* Development of “all natural” layer-by-layer redispersible solid lipid nanoparticles by nano spray drying technology. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. v. 107, p. 273-285, 2016.

WHO. World Health Organization, Skin cancers. 2019. Disponível em: <https://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html> Acesso em 08/06/2019

YOSHIDA, Cristiana Maria Pedroso. **Aplicação de concentrado proteico de soro de leite bovino na elaboração de filmes comestíveis**. Tese (Doutorado) Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 2002.

ZHANG, Shujuan. Preparation of controlled-shape ZnS microcrystals and photocatalytic property. **Ceramics international**. v. 40, n. 3, p. 4553-4557, 2014.