

RESSALVA

Atendendo solicitação da autora, o texto completo desta Dissertação será disponibilizado somente a partir de 29/08/2021.

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
FOTOSENSÍVEIS”

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 Pelloso, 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. CONCLUSÃO	29
REFERÊNCIAS	31

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 fibroblastoide (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.	Erro! Indicador não definido.
Figura 8 - Fotos do eletrodo e coleta da amostra após a atomização pelo Nano Spray Dryer.	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 10 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão (PDI) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 11 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão Vazia (1) e contendo Quinizarina (2) em relação ao tempo.....	28
Figura 12 - Estudo de estabilidade de tamanho de partículas (nm) da Nanoemulsão contendo Quinizarina e CPSL em relação ao tempo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 13- Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanoemulsão contendo Quinizarina e CPSL em relação ao tempo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 14 - Estudo de estabilidade de potencial Zeta (ζ) da Nanoemulsão contendo Quinizarina, CPSL e PMMA em relação ao tempo.....	Erro! Indicador não definido.

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

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

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

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

Figura 19 - Estudo de estabilidade do índice de polidispersão da Nanopartícula Quinizarina (6) e contendo Nanopartícula Vazia (6) em relação ao tempo. **Erro! Indicador não definido.**

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

Figura 21 - Espectros de absorção (A) e emissão (B) de QZ em diferentes concentrações em acetonitrila de grau espectroscópico. **Erro! Indicador não definido.**

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

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

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). **Erro! Indicador não definido.**

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

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. **Erro! Indicador não definido.**

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. .. **Erro! Indicador não definido.**

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 *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (*p<0,05)..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 29 - 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 escuro, com concentrações de 28 µg/mL a 268 µg/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)..... **Erro! Indicador não definido.**

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/cm², com concentrações de 111 µg/mL e 222 µg/mL.**Erro! Indicador não definido.**

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

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.**Erro! Indicador não definido.**

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**Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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. **Erro! Indicador não definido.**

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”.**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Condições experimentais de formulações preparadas **Erro! Indicador não definido.**

Tabela 2 – Parâmetros físico-químicos (diâmetro, índice de polidispersividade e potencial zeta) das diferentes amostras sintetizadas.....**Erro! Indicador não definido.**

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

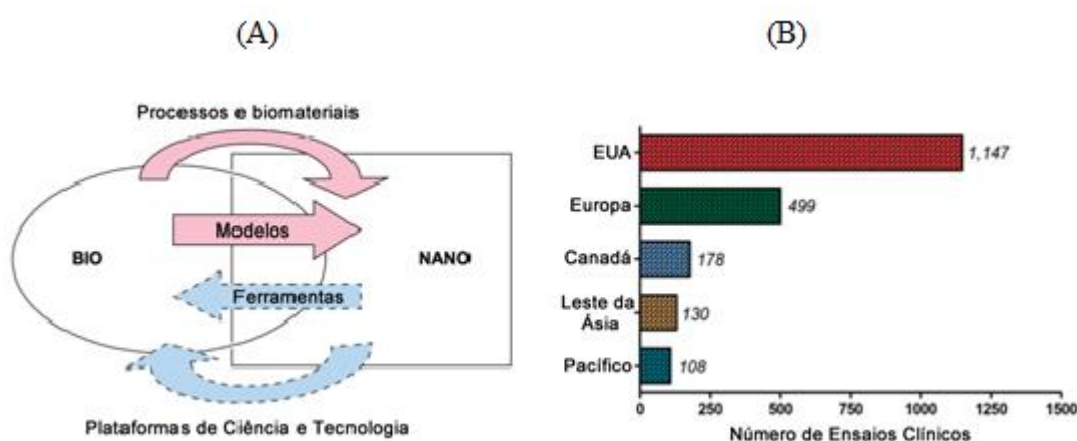
$\mu\text{g/mL}$ - concentração em microgramas / mililitros

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.

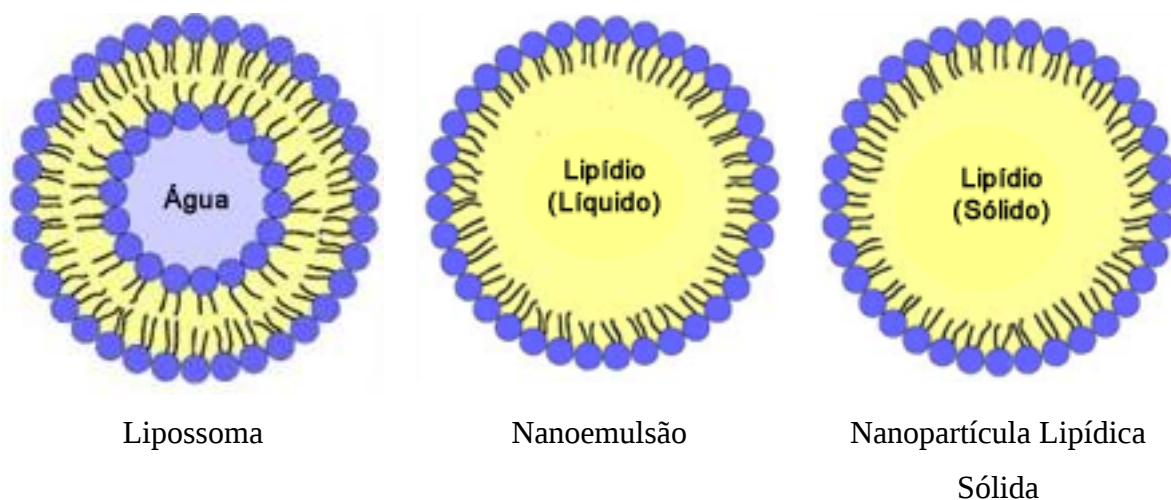
3. REVISÃO DA LITERATURA

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, cosmecêutica 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

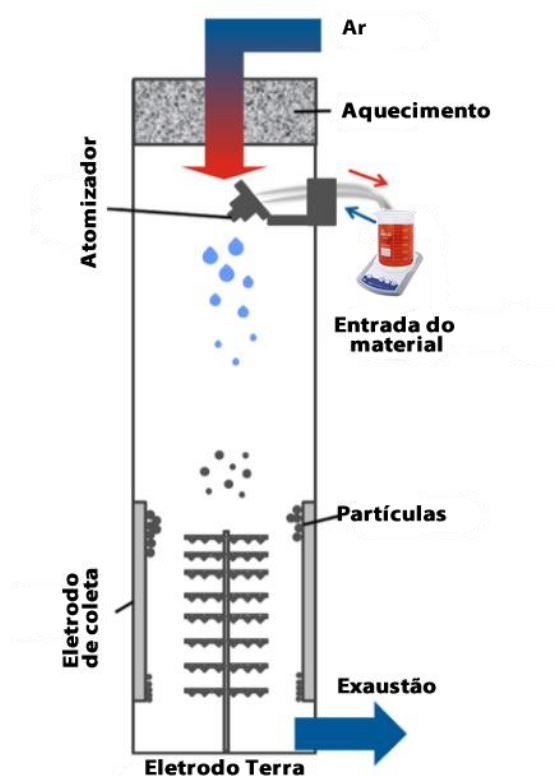
aumento da adesão às membranas celulares, maior taxa de internalização celular e otimização da cinética de biodisponibilidade de fármacos (MÜLLER et al., 2011).

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 piezoeletricidade 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 se 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.

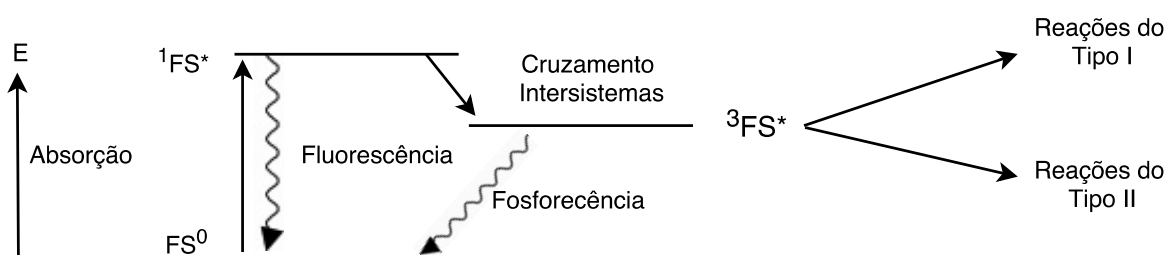
3.2.2. TERAPIA FOTODINÂMICA

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 absorbância 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 singleto ($^1\text{O}_2$), 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 radicalares 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, ânion 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 ($^1\text{O}_2$). 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.

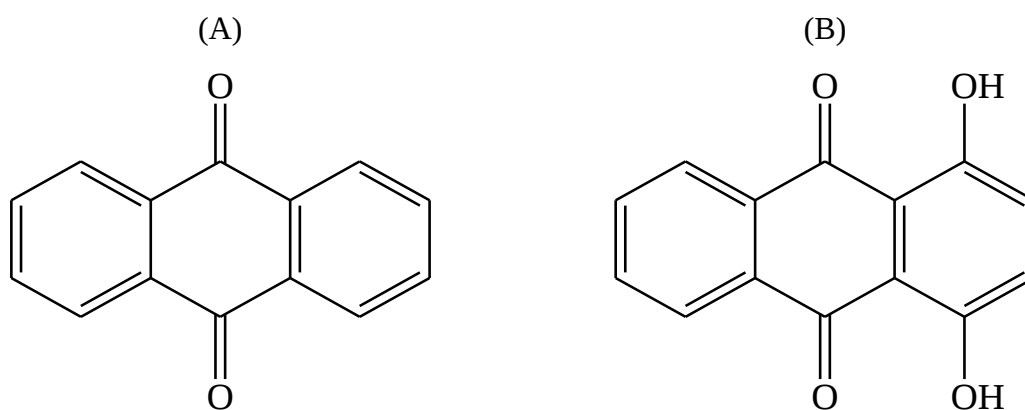
3.3 CORANTES: CONCEITO, CLASSIFICAÇÃO E PRINCIPAIS APLICAÇÕES

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-eletroquímicas 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 poliketídico 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. 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 de 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 freqüentadores 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; ALLÉMAN, 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 α -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.