



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Campus de Araraquara

FERNANDA BORGES DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOEMULSIONADOS CONTENDO
ERITROSINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA
NO TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Araraquara, SP
2025

FERNANDA BORGES DE ALMEIDA

**DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOEMULSIONADOS CONTENDO
ERITROSINA PARA POTENCIAL APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA
NO TRATAMENTO DE GLIOBLASTOMA MULTIFORME**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas UNESP, para obtenção do Título de Doutora em Ciências na área de Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

**Araraquara, SP
2025**

A447d Almeida, Fernanda Borges de.
Desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados contendo Eritrosina para potencial aplicação em Terapia Fotodinâmica no tratamento de glioblastoma multiforme / Fernanda Borges de Almeida. – Araraquara, 2025.
142 f. : il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos.

Orientador: Fernando Lucas Primo.

1. Glioblastoma multiforme. 2. Eritrosina. 3. Nanoemulsão. 4. Terapia fotodinâmica. 5. Baixo aporte de energia. I. Primo, Fernando Lucas, orient. II. Título.

Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP - Campus de Araraquara Kazumi Tomoyose
- CRB 8/10904

CAPES: 33004030078P6
Esta ficha não pode ser modificada

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados contendo Eritrosina para potencial aplicação em Terapia Fotodinâmica no tratamento de glioblastoma multiforme

AUTORA: FERNANDA BORGES DE ALMEIDA

ORIENTADOR: FERNANDO LUCAS PRIMO

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em Ciências, área de conhecimento: Farmácia pela Comissão Examinadora:

Prof. Dr. FERNANDO LUCAS PRIMO (Participação Presencial)
Departamento de Engenharia de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. ANTONIO CLAUDIO TEDESCO (Participação Virtual)
Departamento de Química / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (USP)

Prof. Dr. JOSIMAR DE OLIVEIRA ELOY (Participação Virtual)
Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem / Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. MARLUS CHORILLI (Participação Presencial)
Departamento de Fármacos e Medicamentos / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara da Unesp

Prof. Dr. MARIGILSON PONTES DE SIQUEIRA MOURA (Participação Virtual)
Colegiado Acadêmico de Ciências Farmacêuticas / Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Araraquara, 27 de fevereiro de 2025

Dedico este trabalho aos meus amados pais, Lígia e Ricardo, cuja dedicação, apoio incondicional e palavras de encorajamento transformaram o sonho deste título de doutora em uma realidade.

Fernanda Borges de Almeida

AGRADECIMENTOS

Fernanda Borges de Almeida

Aos meus pais, irmãos, cunhadas e minha sobrinha, minha eterna gratidão por todo o apoio, incentivo, companheirismo e amor incondicional. Vocês foram meu alicerce em cada etapa dessa jornada, e sem vocês ao meu lado, nada disso teria sido possível.

Ao meu namorado, Marcos, por todo o amor, carinho, apoio incondicional, incentivo, parceria e compreensão. Sua presença enche meus dias de leveza e felicidade. Obrigada por ser meu porto seguro.

Aos meus queridos avós, Walter (*in memoriam*) e Aurea, pela herança de amor e pelas preciosas memórias que iluminaram minha infância. Aos meus tios Rogério e Maria, e à minha tia-avó Vilma, pelo constante apoio, incentivo e presença acolhedora.

Aos amigos que a Unesp me trouxe, a jornada na pós-graduação se tornou muito mais leve, enriquecedora e divertida graças à companhia e ao apoio de cada um de vocês.

Ao Grupo de Pesquisa em Nanomateriais e Engenharia de Tecidos da Unesp Araraquara, pela amizade sincera, pelas parcerias que tanto me ensinaram, pelas risadas que aliviaram dias difíceis, pelos momentos de descontração e, principalmente, pelo colo nas horas de choro e desespero. Agradeço, em especial, ao meu orientador, Prof. Dr. Fernando Lucas Primo, por ter aceitado o desafio de me orientar, mesmo quando já estava com dois anos de doutorado em andamento. Ser sua aluna foi um privilégio transformador. Obrigada não apenas pela orientação técnica e científica, mas também por sua confiança, incentivo constante e por sua empatia nos momentos mais desafiadores.

Ao Grupo de Fotobiologia e Fotomedicina, do Centro de Nanotecnologia e Engenharia Tecidual (CNET), da USP-Ribeirão Preto. Pela doação da linhagem celular T98-G e pelo auxílio nas análises de Tempo de Vida de Fluorescência e LUMiSizer®.

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano), do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais (CNPEM), uma Organização Social supervisionada pelo Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovações (MCTI, Brasil). Pelas análises de Microscopia de Força Atômica (nº 20241217) e Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (nº 20243078) e pela assistência durante os experimentos.

Ao Grupo de Tecnologia Farmacêutica Inovadora da Unesp Araraquara pelas análises de NTA, que faz parte do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Nanotecnologia Farmacêutica: uma abordagem transdisciplinar INCT-NANOFARMA, que é apoiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, Brasil), concessão nº 2014/50928-2, e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq, Brasil), concessão nº 465687/2014-8. Além das análises de Reologia, TPA e DLS.

Aos funcionários, prestadores de serviço e técnicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP Araraquara, registro minha gratidão pelo profissionalismo, comprometimento e dedicação. Em especial, agradeço aos funcionários Tirene Pavanelli e Percival Camargo, e aos técnicos Ana Nasser, Adriana Candido, Ivan Veloso, Flávio Picheli e Mateus Scontri, cujo suporte incansável, expertise e colaboração foram fundamentais para o sucesso desta jornada.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, projeto nº 140185/2021-6.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Um cientista em seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que o impressionam como se fossem conto de fadas.”

Marie Curie

Declaro ter desenvolvido e elaborado o presente trabalho em consonância com o Código de Ética da Unesp. Afirmando não ter incorrido em qualquer das variedades de fraude acadêmica, que aqui declaro conhecer, e que atendi à exigida referência de frases, extratos, imagens e outras formas de trabalho intelectual, assumindo, na íntegra, as responsabilidades de autoria.

RESUMO

Os gliomas são os tipos de tumores do sistema nervoso central mais comuns e dentre todos os tipos, o glioblastoma multiforme (GBM) é o mais frequente e agressivo de câncer de cérebro. Embora isso ocorra os tratamentos disponíveis atualmente, não apresentam uma alta eficácia no combate à doença. Sendo assim, a terapia fotodinâmica se apresenta como uma alternativa complementar aos tratamentos tradicionais. A Eritrosina é um corante de origem natural, da classe dos xantenos, amplamente utilizado na indústria alimentícia e de produtos cosméticos e que apresenta um enorme potencial de aplicação na TFD como substância fotossensibilizadora. Embora apresente esse potencial, a sua baixa estabilidade em água é um limitador para a sua utilização. Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados contendo Eritrosina é uma excelente estratégia para solucionar esse problema. Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoemulsionados contendo Eritrosina para potencial aplicação em terapia fotodinâmica no tratamento de GBM. Para isso foi feito o desenvolvimento e validação de metodologia analítica de quantificação da Eritrosina por espectrofotometria de absorção, o desenvolvimento dos sistemas nanoemulsionados, a caracterização fotofísica, físico-química e estrutural das nanoemulsões e ensaios de avaliação da internalização celular, avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões em cultura celular 2D com a linhagem celular HDFn e avaliação da atividade fotodinâmica das nanoemulsões *in vitro* em cultura celular 2D com a linhagem celular T98-G. Ao término dos experimentos, foi possível determinar o perfil de absorção e emissão da fluorescência UV-Vis da Eritrosina, sendo 526 nm o comprimento de onda máximo de absorção e, 550 nm o máximo de emissão. Desenvolver metodologia analítica para quantificação da Eritrosina, facilmente executável, de baixo custo, linear, precisa, exata e robusta. Além disso, foi possível desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão contendo Eritrosina, sem o uso de aquecimento e solventes orgânicos. Por fim, a formulação demonstrou ser segura frente à linhagem HDFn, embora não tenha apresentado atividade fotodinâmica frente à linhagem tumoral T98-G nas doses e concentração avaliadas. Dessa maneira, os resultados apresentados nesta tese contribuirão para a ampliação do conhecimento sobre sistemas nanoemulsionados obtidos por baixo aporte energético, sem o uso de solventes orgânicos ou aquecimento, com ou sem Eritrosina em sua composição. Além disso, fortalecerão a compreensão dos processos fotodinâmicos como alternativas promissoras para o tratamento complementar do GBM.

Palavras-chave: glioblastoma multiforme; eritrosina; nanoemulsão; terapia fotodinâmica; baixo aporte de energia.

ABSTRACT

Gliomas are the most common type of central nervous system tumor, and among them, glioblastoma multiforme (GBM) is the most prevalent and aggressive form of brain cancer. Despite this, current treatments are not highly effective in combating the disease. As such, photodynamic therapy (PDT) presents a complementary alternative to traditional treatments. Erythrosine, a natural dye from the xanthenes class, is widely used in the food and cosmetics industries and has significant potential as a photosensitizing agent in PDT. However, its low stability in water limits its effectiveness. In this context, the development of nanoemulsion systems containing Erythrosine is an excellent strategy to overcome this challenge. Therefore, this study aimed to develop and characterize nanoemulsion systems containing Erythrosine for potential application in PDT for GBM treatment. To achieve this, we developed and validated an analytical method for quantifying Erythrosine using absorption spectrophotometry. We also developed nanoemulsion systems and conducted photophysical, physicochemical, and structural characterizations. Additionally, we performed tests to evaluate cell internalization, assess the cytotoxic activity of the nanoemulsions in 2D cell cultures using the HDFn cell line, and evaluate their photodynamic activity *in vitro* in 2D cell cultures using the T98-G cell line. After the experiments, we determined the UV-Vis absorption and emission profile of Erythrosine, with a maximum absorption wavelength at 526 nm and a maximum emission wavelength at 550 nm. We also developed an easy-to-execute, low-cost, linear, precise, accurate, and robust analytical methodology for quantifying Erythrosine. Furthermore, we successfully developed and characterized a nanoemulsion containing Erythrosine, without the use of heating or organic solvents. Lastly, the formulation was found to be safe for the HDFn strain, though it did not demonstrate photodynamic activity against the T98-G tumor strain at the evaluated doses and concentrations. The results presented in this thesis will significantly contribute to expanding knowledge about nanoemulsion systems produced with low energy input, without organic solvents or heating, with or without Erythrosine. These findings will also enhance our understanding of photodynamic processes as promising complementary treatments for GBM.

Keywords: glioblastoma multiforme; erythrosine; nanoemulsion; photodynamic therapy; low energy input.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Desenho esquemático ilustrando as células da glia e um glioma	33
Figura 2 – Ilustração esquemática do protocolo de aplicação da terapia fotodinâmica	36
Figura 3 – Ilustração da aplicação da TFD por micro incisões e campo aberto durante a cirurgia de ressecção tumoral (1). Mecanismos de ação Tipo I e Tipo II da TFD ilustrados no Diagrama de Jablonski simplificado (2)	37
Figura 4 – Eritrosina (A); Estrutura química da Eritrosina (B)	38
Figura 5 – Tipos de nanoemulsões	40
Figura 6 – Tipos de instabilidade das nanoemulsões	41
Figura 7 – Esquema ilustrativo do preparo das soluções de Eritrosina usadas para a determinação da linearidade	49
Figura 8 – Esquema ilustrativo de síntese das nanoemulsões	52
Figura 9 – Diagrama de fases pseudoternário	54
Figura 10 – Esquema ilustrativo de síntese das nanoemulsões dando ênfase na adição de Eritrosina	55
Figura 11 – Esquema ilustrativo das etapas para determinação da eficiência de associação da Eritrosina nas nanoemulsões	56
Figura 12 - Esquema de gelificação da NEE	57
Figura 13 - Esquema ilustrativo do equipamento LUMiSizer® (A); Amostras alocadas nas cubetas e afixadas no rotor do equipamento (B); Ilustração esquemática da incidência da luz NIR através da amostra até o sensor (C)	61
Figura 14 - Foto dos equipamentos <i>Pelco easiGlow</i> (A) e <i>Vitrobot Mark IV System</i> (B)	63
Figura 15 – Desenho esquemático do aparato de célula de Franz utilizado no ensaio de liberação <i>in vitro</i>	64
Figura 16 – Representação esquemática da estratégia experimental do ensaio de citotoxicidade e ensaio de internalização celular com linhagem celular comercial HDFn	66
Figura 17 – Representação esquemática das etapas necessárias para a realização do ensaio de internalização celular.	67
Figura 18 – Representação esquemática das etapas necessárias para a realização do ensaio de avaliação da atividade citotóxica	68

Figura 19 – Foto do ensaio de eficácia baseado na TFD <i>in vitro</i> . Luz LED em 500 nm de alta potência (Fotopolimerizador Optilight Max, Dabi Atlante, Brasil) sendo administrada sobre os poços contendo células tumorais da linhagem comercial T98-G em monocamada	69
Figura 20 – Representação esquemática das etapas necessárias para a realização do ensaio de TFD em cultura celular	70
Figura 21 – Curvas analíticas da Eritrosina em acetonitrila e tampão fosfato obtida pelo método espectrofotométrico de absorção no UV-visível (n = 3)	73
Figura 22 – Gráficos de resíduos da linearidade em acetonitrila e tampão fosfato	74
Figura 23 – Tabelas com resultados da análise de variância das médias das absorbâncias em acetonitrila e tampão fosfato	74
Figura 24 – Tabelas com resultados da análise de variância das médias das absorbâncias entre os analistas no estudo de precisão intermediária do método analítico	76
Figura 25 – Formulações sintetizadas para escolha do melhor par de tensoativos	81
Figura 26 – Distribuição de gotículas por intensidade populacional das formulações N2, N3 e N8	82
Figura 27 – Formulações obtidas a partir dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário	85
Figura 28 – Região de formação de nanoemulsões do diagrama de fases pseudoternário	86
Figura 29 – Formulações obtidas a partir dos pontos intermediários do diagrama de fases pseudoternário	87
Figura 30 – Formulações I1 e I2 incorporadas com Eritrosina. A: 0,1 mg·mL ⁻¹ ; B: 0,05 mg·mL ⁻¹ ; C: 0,01 mg·mL ⁻¹	89
Figura 31 – Espectro de absorção no UV-Vis da Eritrosina em água (A) ; Espectro de emissão da fluorescência no UV-Vis da Eritrosina em água (B)	91
Figura 32 – Espectros bidimensionais (2D) da intensidade de fluorescência da nanoemulsão contendo Eritrosina (NEE) e da Eritrosina livre (EL) em água ultrapura. A: Espectro não normalizado; B: Espectro normalizado	93

Figura 33 – Espectros tridimensionais (3D) da intensidade de emissão de fluorescência em função da excitação para as amostras de Eritrosina livre em água ultrapura (A) e da nanoemulsão contendo Eritrosina (B)	94
Figura 34 – Espectros normalizados da emissão de fluorescência bidimensional no UV-visível para a determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f)	96
Figura 35 – Nanoemulsões contendo Eritrosina 24 h após a síntese e após 90 dias de armazenamento nas diferentes condições de estresse	100
Figura 36 – Resultados dos parâmetros analisados no estudo de estabilidade. Diâmetro hidrodinâmico médio (A); Índice de polidispersão (B); Potencial Zeta (C); Teor de Eritrosina (D)	101
Figura 37 – Perfil de transmitância da análise de estabilidade por centrifugação analítica (LUMiSizer®) da NEB (A) e da NEE (B)	103
Figura 38 – Espectros de FTIR-ATR as amostras de Eritrosina livre (A), Tween 20 (B), NEB (C), Miristato de isopropila (D), Span 80 (E), e NEE (F)	104
Figura 39 – Imagens de Microscopia de Força Atômica das formulações NEB (A) e NEE (B)	106
Figura 40 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM) das formulações NEB (A) e NEE (B)	108
Figura 41 – Imagens de Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM) das nanoemulsões NEB (A) e NEE (B)	109
Figura 42 – Perfil de liberação <i>in vitro</i> da Eritrosina em nanoemulsão gelificada (A) e livre (B)	111
Figura 43 – Curvas de fluxo (A) e de viscosidade (B) para caracterização reológica de NEEGel	113
Figura 44 – Resultado do ensaio de varredura de frequência para NEEGel	114
Figura 45 – Ensaio de internalização celular em HDFn da Eritrosina livre e em nanoemulsão em diferentes concentrações e tempos de incubação. Os efeitos estatísticos foram analisados empregando-se o método ANOVA seguido do pós-teste Šídák para múltiplas comparações ($p > 0,05^*$) com número de repetições $n = 3$	117
Figura 46 – Resultados do ensaio de viabilidade celular em HDFn após 30 min de tratamento com Eritrosina (EL), NEB e NEE (A), após 90 min de tratamento (B) e a comparação entre os dois tempos de tratamento (C). Os efeitos estatísticos foram	

analizados empregando-se o método ANOVA seguido do pós-teste Dunnett para múltiplas comparações ($p > 0.05^*$) com número de repetições $n = 3$ 119

Figura 47 – Resultados obtidos no ensaio de TFD *in vitro* usando NEE ($1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), após 90 minutos de incubação, em células de GBM da linhagem T98-G sob fotoativação nas doses/fluências de 15, 30 e 50 J/cm^2 , empregando-se o sistema Fotopolimerizador Optilight Max calibrado em 500 nm. CT = controle somente células sem fotoativação e formulação; CT 50 J = somente fotoativação na maior dose/fluência. Os efeitos estatísticos foram analisados empregando-se o método ANOVA seguido do pós-teste Dunnett para múltiplas comparações ($p > 0.05^*$) com número de repetições $n = 6$ 121

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Valores de absorvância em 530 nm referentes às concentrações de Eritrosina em acetonitrila utilizadas para a determinação da linearidade do método analítico	72
Tabela 2 – Valores de absorvância referentes às concentrações de Eritrosina em tampão fosfato utilizadas para a determinação da linearidade do método analítico	73
Tabela 3 – Valores de absorvância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila no estudo de repetibilidade do método analítico	75
Tabela 4 – Valores de absorvância em 525 nm da Eritrosina em tampão fosfato no estudo de repetibilidade do método analítico	75
Tabela 5 – Valores de absorvância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila no estudo de precisão intermediária do método analítico	75
Tabela 6 – Valores de absorvância em 525 nm da Eritrosina em tampão fosfato no estudo de precisão intermediária do método analítico	76
Tabela 7 – Valores de absorvância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila para a determinação da exatidão do método analítico	77
Tabela 8 – Valores de absorvância em 525 nm da Eritrosina em solução tampão fosfato para a determinação da exatidão do método analítico	77
Tabela 9 – Dados da linearidade utilizados para a determinação dos limites de detecção e quantificação da Eritrosina em acetonitrila	78
Tabela 10 – Dados da linearidade utilizados para a determinação dos limites de detecção e quantificação da Eritrosina em solução tampão fosfato	78
Tabela 11 – Valores de absorvância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila para a determinação da robustez do método analítico	78
Tabela 12 – Valores de absorvância em 525 nm da Eritrosina em solução tampão fosfato para a determinação da robustez do método analítico	79
Tabela 13 – Avaliação da solubilidade da Eritrosina em diferentes matérias-primas	79
Tabela 14 – Proporção de tensoativos utilizados no desenvolvimento da nanoemulsão	81
Tabela 15 – Caracterização das formulações que não apresentaram instabilidade quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta	82

Tabela 16 – Composição percentual das formulações obtidas a partir dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário	84
Tabela 17 – Caracterização das formulações obtidas a partir dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário, que não apresentaram instabilidade, quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta	85
Tabela 18 – Composição percentual das formulações obtidas a partir dos pontos intermediários do diagrama de fases pseudoternário	87
Tabela 19 – Caracterização das formulações obtidas a partir dos pontos intermediários do diagrama de fases pseudoternário, que não apresentaram instabilidade, quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta	88
Tabela 20 – Caracterização das formulações incorporadas com Eritrosina quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta	89
Tabela 21 – Composição percentual da nanoemulsão contendo Eritrosina (NEE) ...	89
Tabela 22 – Resultados do ensaio de determinação da eficiência de associação da Eritrosina nas nanoemulsões	90
Tabela 23 – Resultados de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) da Eritrosina livre e em nanoemulsão após digestão em ACN	95
Tabela 24 – Tempo de vida de fluorescência (τ) para a Eritrosina livre e em nanoemulsão, amplitude percentual (A) e seus parâmetros de ajuste (χ^2)	97
Tabela 25 – Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta das nanoemulsões	98
Tabela 26 – Tamanho, concentração de partículas/mL e índice span das nanoemulsões	99
Tabela 27 – Dados de estabilidade obtidos por centrifugação analítica (LUMiSizer®)	102
Tabela 28 – Resultado dos diferentes modelos matemáticos para determinar a cinética de liberação da Eritrosina em nanoemulsão gelificada	112
Tabela 29 – Resultados da análise do perfil de textura de NEEGel	115

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACN	Acetonitrila
BO3	Oleth-3
CMD	Concentração média determinada
CT	Concentração teórica
DHM	Diâmetro hidrodinâmico médio
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DP	Desvio padrão
DPR	Desvio padrão relativo
EHL	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo
EHLr	Equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido
EL	Eritrosina livre
ERO	Espécies reativas de oxigênio
EtOH	Etanol
FTIR-ATR	Infravermelho com transformada de Fourier e reflectância atenuada
GBM	Glioblastoma
IC	Inclinação da curva
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
mV	Milivolts
AFM	Microscopia de Força Atômica
STEM	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura
Cryo-TEM	Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão
NE	Nanoemulsão
NEs	Nanoemulsões
NEB	Nanoemulsão vazia
NEE	Nanoemulsão com Eritrosina
NEEA	Nanoemulsão com Eritrosina armazenada na condição ambiente
NEEE	Nanoemulsão com Eritrosina armazenada na condição estufa
NEEG	Nanoemulsão com Eritrosina armazenada na condição refrigerador
NEEGel	Nanoemulsão com Eritrosina Gelificada
nm	Nanômetro
NTA	Análise de rastreamento de nanopartículas

PBS	Tampão fosfato-salino
PdI	Índice de polidispersão
PZ	Potencial Zeta
S20	Monolaurato de sorbitano
S80	Monooleato de sorbitano
S85	Trioleato de sorbitano
SM	Solução mãe
ST	Solução de trabalho
T20	Polissorbato 20
T80	Polissorbato 80
TFD	Terapia fotodinâmica
TPA	Análise do perfil de textura
UV-Vis	Ultravioleta-visível
ϕ_f	Rendimento quântico de fluorescência
τ	Tempo de vida de fluorescência

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	31
2	REVISÃO DA LITERATURA	33
2.1	Glioblastoma	33
2.2	Terapia Fotodinâmica	35
2.3	Eritrosina	38
2.4	Sistemas de liberação de fármacos: Nanoemulsões	39
3	OBJETIVOS	46
3.1	Objetivo geral	46
3.2	Objetivos específicos	46
4	MATERIAL E MÉTODOS	48
4.1	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de quantificação da Eritrosina por espectrofotometria de absorção no UV-Vis	48
4.1.1	Linearidade	48
4.1.2	Precisão	49
4.1.3	Exatidão	50
4.1.4	Limites de detecção e quantificação	50
4.1.5	Robustez	51
4.2	Desenvolvimento dos sistemas nanoemulsionados	51
4.2.1	Avaliação da solubilidade da Eritrosina em diferentes matérias-primas	51
4.2.2	Síntese da nanoemulsão	51
4.2.3	Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação	52
4.2.4	Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário	53
4.2.5	Incorporação da Eritrosina nas nanoemulsões	54
4.2.6	Doseamento do teor de Eritrosina nas nanoemulsões	55
4.2.7	Gelificação das nanoemulsões	56
4.3	Caracterização fotofísica	57
4.3.1	Determinação do perfil de absorção e de emissão de fluorescência no UV/Vis por espectrofotometria da Eritrosina livre e em nanoemulsão	57
4.3.2	Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão	58

4.3.3	Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão	59
4.4	Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões	59
4.4.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio por espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta por mobilidade eletroforética	59
4.4.2	Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	59
4.4.3	Estudo de estabilidade	60
4.4.3.1	Influência de diferentes condições de estresse em função do tempo	60
4.4.3.2	Estudo de estabilidade de longa duração por centrifugação analítica	60
4.4.4	Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância atenuada (FTIR-ATR)	61
4.4.5	Microscopia de Força Atômica (AFM)	62
4.4.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão	62
4.4.6.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM)	62
4.4.6.2	Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)	62
4.4.7	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da Eritrosina da nanoemulsão gelificada em células de Franz	63
4.4.8	Reologia da nanoemulsão gelificada	65
4.4.9	Análise do perfil de textura (TPA) da nanoemulsão gelificada	65
4.5	Cultura celular	66
4.5.1	Avaliação da internalização celular (UPTAKE)	66
4.5.2	Avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões em cultura celular 2D com a linhagem celular HDFn	67
4.5.3	Ensaio de eficácia baseado na atividade fotodinâmica das nanoemulsões <i>in vitro</i> em cultura celular 2D com a linhagem celular T98-G	68
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
5.1	Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de quantificação da Eritrosina por espectrofotometria de absorção no UV-Vis	72
5.1.1	Linearidade	72
5.1.2	Precisão	74
5.1.3	Exatidão	76
5.1.4	Limites de detecção e quantificação	77

5.1.5	Robustez	78
5.2	Desenvolvimento dos sistemas nanoemulsionados	79
5.2.1	Avaliação da solubilidade da Eritrosina em diferentes matérias-primas	79
5.2.2	Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação	80
5.2.3	Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário	83
5.2.4	Incorporação da Eritrosina nas nanoemulsões	88
5.2.5	Doseamento do teor de Eritrosina nas nanoemulsões	89
5.3	Caracterização fotofísica	90
5.3.1	Determinação do perfil de absorção e de emissão de fluorescência no UV/Vis por espectrofotometria da Eritrosina livre e em nanoemulsão	90
5.3.2	Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão	95
5.3.3	Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão	97
5.4	Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões	98
5.4.1	Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio por espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta por mobilidade eletroforética	98
5.4.2	Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)	99
5.4.3	Estudo de estabilidade	100
5.4.3.1	Influência de diferentes condições de estresse em função do tempo	100
5.4.3.2	Estudo de estabilidade de longa duração por centrifugação analítica	102
5.4.4	Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância atenuada (FTIR-ATR)	103
5.4.5	Microscopia de Força Atômica (AFM)	105
5.4.6	Microscopia Eletrônica de Transmissão	107
5.4.6.1	Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM)	107
5.4.6.2	Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)	109
5.4.7	Determinação do perfil de liberação <i>in vitro</i> da Eritrosina da nanoemulsão gelificada em células de Franz	111
5.4.8	Reologia da nanoemulsão gelificada	113

5.4.9	Análise do perfil de textura (TPA) da nanoemulsão gelificada	116
5.5	Cultura celular	116
5.5.1	Avaliação da internalização celular (UPTAKE)	116
5.5.2	Avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões em cultura celular 2D com a linhagem celular HDFn	118
5.5.3	Ensaio de eficácia baseado na atividade fotodinâmica das nanoemulsões <i>in vitro</i> em cultura celular 2D com a linhagem celular T98-G	120
6	CONCLUSÃO	123
	REFERÊNCIAS	126
	APÊNDICE A - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA METODOLOGIA E ESTRATÉGIA INVESTIGATIVA	141

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os gliomas são os tipos de tumores do sistema nervoso central mais comuns e dentre todos os tipos, o glioblastoma (GBM) é o mais frequente e agressivo de câncer de cérebro. É originário dos astrócitos, um tipo de célula da glia, e apresenta elevada mortalidade e possui alta taxa de recidiva, levando a um tempo médio de sobrevivência do paciente de até 15 meses.

Os sintomas mais frequentes apresentados por pacientes acometidos por GBM, independentemente do tipo, são cefaleias, deficiências neurológicas focais, confusão, perda de memória, alterações da personalidade ou convulsões. Embora esse tipo de câncer de cérebro seja o mais comum e extremamente severo, os tratamentos disponíveis atualmente, não apresentam uma alta eficácia no combate à doença.

Sendo assim, a terapia fotodinâmica (TFD) se apresenta como uma alternativa complementar aos tratamentos tradicionais. A TFD consiste em uma terapia minimamente invasiva em que a morte celular de um tecido alvo é induzida pela luz através de moléculas fotossensibilizadoras na presença de oxigênio.

Dessa maneira, a presença de moléculas fotossensibilizadoras é primordial para a aplicação da TFD. A Eritrosina é um corante de origem natural, da classe dos xantenos, amplamente utilizado na indústria alimentícia e de produtos cosméticos e que apresenta um enorme potencial de aplicação na TFD como substância fotossensibilizadora. Embora apresente esse enorme potencial, a sua baixa estabilidade em água é um limitador para a sua utilização.

Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados contendo Eritrosina é uma excelente estratégia para solucionar esse problema. Além disso, pode promover melhor estabilidade físico-química e por consequência maior potencial fotodinâmico.

Sendo assim, o objetivo desse trabalho foi desenvolver e caracterizar sistemas nanoemulsionados contendo Eritrosina para potencial aplicação em terapia fotodinâmica no tratamento de glioblastoma.

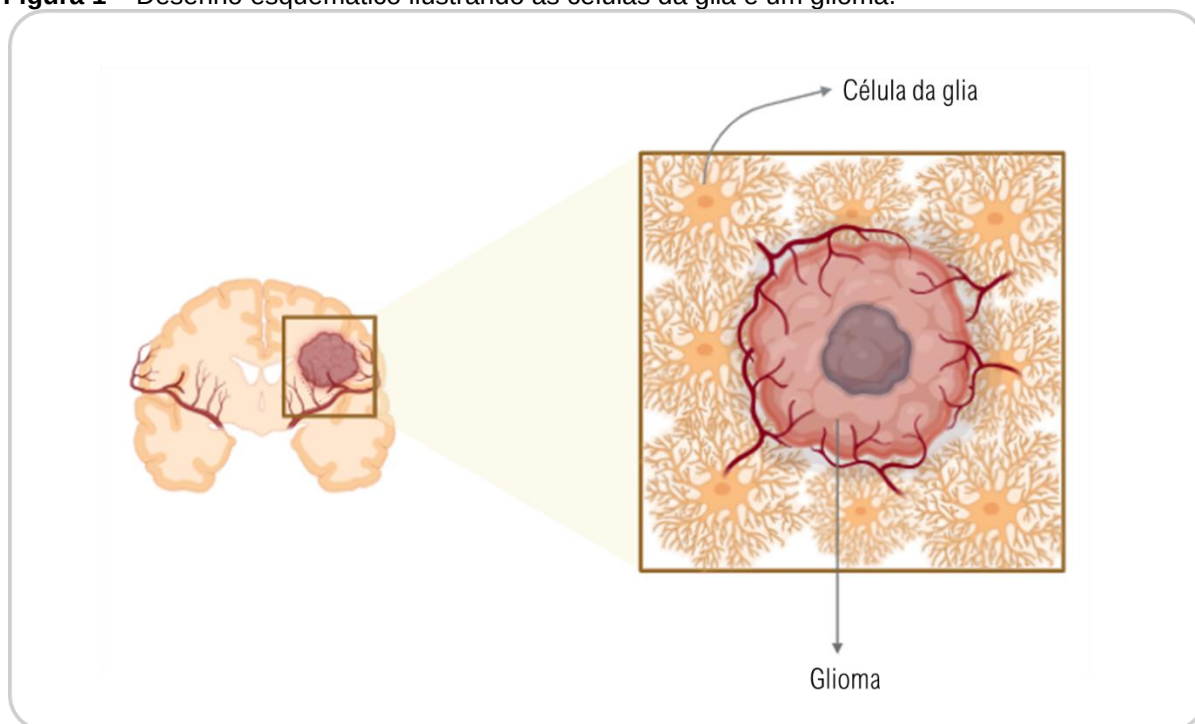
REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glioblastoma

Os gliomas são tumores cerebrais raros oriundos de alterações malignas das células da glia, que são células de sustentação do tecido nervoso (Figura 1). Esses tipos de tumores correspondem a apenas 2% de todos os cânceres de ocorrência em adultos (Brasil, 2020). Em relação a adolescentes e jovens adultos (15 a 29 anos) a incidência dos tumores de SNC correspondem a 6% de todos os tipos que acometem essa população.

Figura 1 – Desenho esquemático ilustrando as células da glia e um glioma.



Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com

Os gliomas são classificados em quatro graus, de acordo com os achados histopatológicos das lesões, são eles (Brasil, 2020; Liu *et al.*, 2023):

- Grau I: Lesões não infiltravas, com baixo potencial proliferativo, sem atipias nucleares, mitoses, proliferação endotelial ou necrose.
- Grau II: Lesões em geral infiltravas, com atipias nucleares e baixo índice mitótico, sem proliferação endotelial ou necrose.

- Grau III: Lesões infiltravas, com dois critérios presentes, em geral atípicas nucleares e alto índice mitótico.
- Grau IV: Lesões infiltravas, com três ou quatro critérios presentes.

O Glioblastoma (GBM) é o tipo mais frequente e agressivo de glioma (Grau IV) e apresenta elevada taxa de mortalidade (Aldoghachi *et al.*, 2022; Alifieris e Trafalis, 2015; Almammadov *et al.*, 2022; Cramer e Chen, 2020; Filippo, Di *et al.*, 2021). Além disso, possui alto índice de recidiva, levando a um tempo médio de sobrevida do paciente de até 15 meses (Aldoghachi *et al.*, 2022; Anjum *et al.*, 2017; Brasil, 2020; Cramer e Chen, 2020). Os principais sinais e sintomas associados ao surgimento dos gliomas são cefaleias, deficiências neurológicas focais, confusão, perda de memória, alterações da personalidade e/ou convulsões (Alifieris e Trafalis, 2015; Brasil, 2020).

Segundo o trabalho publicado por Silva e colaboradores (2024), foi realizado um estudo transversal retrospectivo de abordagem quantitativa entre os anos de 2012 e 2021, a prevalência de GBM foi determinada em 6,04 casos a cada 100 mil habitantes, com distribuição heterogênea entre os estados brasileiros e com incidência aumentada após os 50 anos de idade (Silva *et al.*, 2024).

Em relação aos fatores de risco associados, a exposição à radiação ionizante é o único fator de risco ambiental, atualmente, comprovadamente associado ao surgimento de tumores cerebrais. Além disso, a codeleção 1p/19q, mutações no gene da isocitrato desidrogenase (IDH) 1 e 2 e metilação de MGMT são os principais marcadores genético-moleculares associados ao surgimento de gliomas (Brasil, 2020).

Para obtenção do diagnóstico e determinação da extensão tumoral é necessária avaliação através de tomografia computadorizada contrastada complementada por ressonância magnética. Essas avaliações de neuroimagem são fundamentais para a escolha do tratamento adequado ao paciente (Brasil, 2020).

Em relação ao plano de tratamento, independente do grau da lesão apresentada, o tratamento cirúrgico é o padrão-ouro, com máxima resseção tumoral, desde que não haja comprometimento da função neurológica e a localização do tumor permita a intervenção cirúrgica. Além disso, a radioterapia e a quimioterapia também são opções de tratamento comumente utilizadas, seja de maneira isolada ou associada a resseção tumoral (Aldoghachi *et al.*, 2022; Alifieris e Trafalis, 2015; Brasil, 2020; Filippo, Di *et al.*, 2021; Huang *et al.*, 2021; Pepper, Stummer e Eich, 2022). Entretanto, muitas vezes esses tratamentos não são capazes de trazer a cura, seja

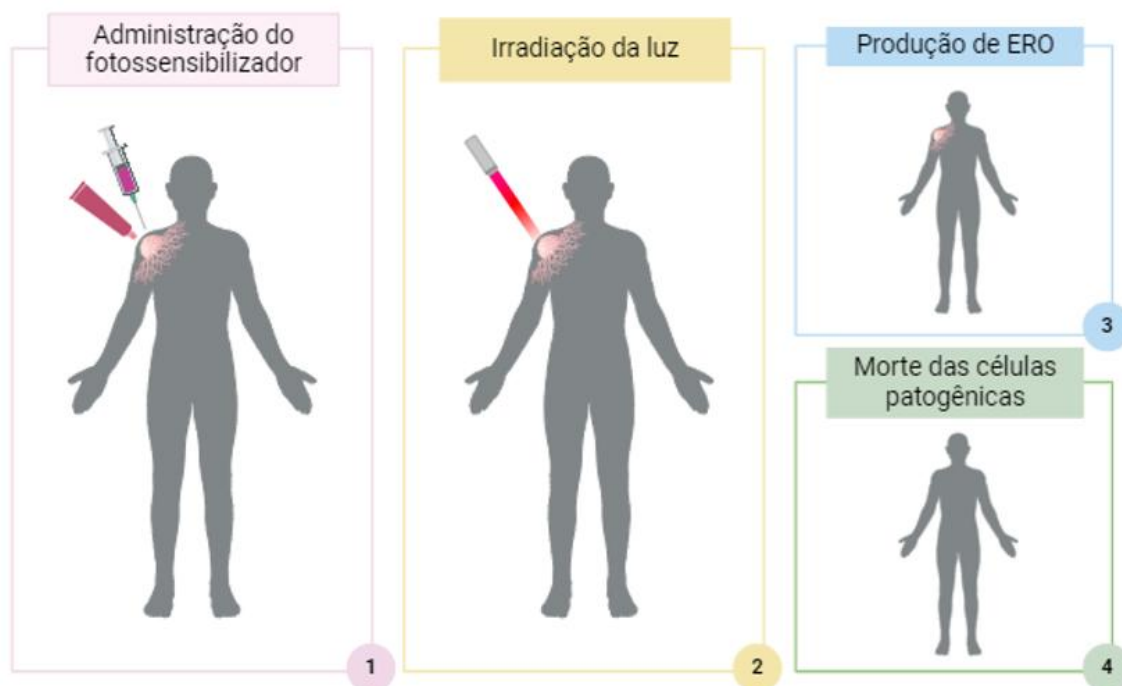
em razão da cirurgia de ressecção não ser capaz de remover todo o conteúdo tumoral, devido a extensão da lesão, ou pela presença de células tronco de glioma que contribuem para a recidiva da doença. Além disso, a barreira hematoencefálica promove um desafio a mais no tratamento, pois dificulta o acesso de diversas drogas quimioterápicas, administradas por via oral ou parenteral, ao tumor localizado no cérebro, reduzindo a eficácia dos tratamentos medicamentosos (Aldoghachi *et al.*, 2022; Alifieris e Trafalis, 2015; Mooney *et al.*, 2019; Wu *et al.*, 2021).

Nesse contexto, a terapia fotodinâmica se apresenta como uma alternativa de terapia, minimamente invasiva, complementar aos tratamentos tradicionais já utilizados nos cânceres cerebrais, visto que é possível a administração do fotossensibilizador seguido da aplicação da luz localmente, diretamente sobre a lesão durante a cirurgia de ressecção tumoral utilizando micro cânulas e/ou feixes de fibra óptica.

2.2 Terapia Fotodinâmica

A Terapia Fotodinâmica (TFD), foi em 2023, incorporada ao Sistema Único de Saúde (SUS), através da publicação da Portaria SECTICS/MS nº 46, de 5 de setembro de 2023 (Brasil, 2023), como alternativa de tratamento para o câncer de pele não melanoma do tipo carcinoma basocelular superficial e nodular, o tipo de câncer com maior incidência no Brasil (Brasil, 2022). E, em março de 2024, foi publicado o Protocolo de Uso, elaborado pelo Ministério da Saúde para orientar os profissionais da saúde quanto a utilização segura e correta desse tratamento (Brasil, 2024).

A TFD consiste em uma terapia minimamente invasiva em que a morte celular de um tecido alvo é induzida pela luz através de moléculas fotossensibilizadoras na presença de oxigênio (Aires-Fernandes, Amantino, *et al.*, 2022; Aldoghachi *et al.*, 2022; Amaral, do *et al.*, 2022; Cramer e Chen, 2020; Evangelista, 2019) (Figura 2). Os mecanismos de ação da TFD podem ser de dois tipos; Tipo I e Tipo II.

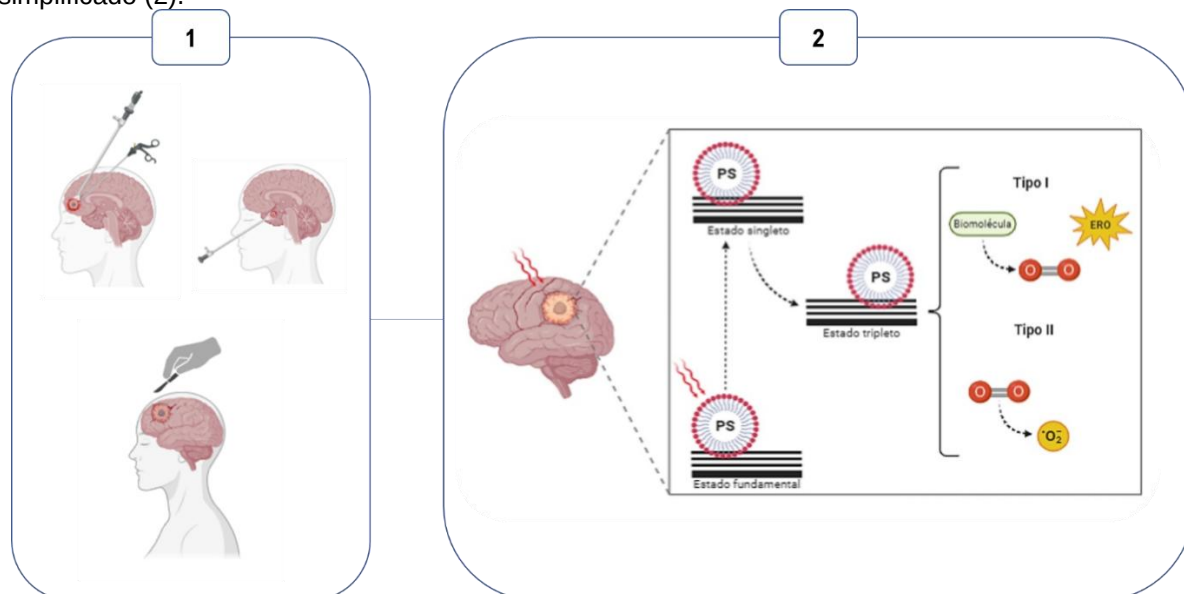
Figura 2 – Ilustração esquemática do protocolo de aplicação da terapia fotodinâmica.

Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com.

O mecanismo Tipo I ocorre quando a molécula do fotossensibilizador é excitada pela luz e passa do estado fundamental para o estado singlete. Após a excitação, devido a um processo de inversão de spin, denominado cruzamento intersistemas, o fotossensibilizador passa para um estado menos excitado, tripleto. No estado tripleto, o fotossensibilizador transfere a energia para biomoléculas, resultando na formação de um radical livre, essas espécies radicalares, transferem elétrons para o oxigênio molecular que está difundido no meio, levando a formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) que irão induzir a morte celular (Aires-Fernandes, Amantino, *et al.*, 2022; Cramer e Chen, 2020; Evangelista, 2019; Kielbik *et al.*, 2019; Vasilev *et al.*, 2020).

Já no mecanismo Tipo II, o fotossensibilizador quando atinge o estado tripleto, transfere energia diretamente para o oxigênio molecular, presente naturalmente no estado tripleto. Após essa transferência, o oxigênio passa para o seu estado mais energético, singlete, que possui propriedades fortemente oxidantes, o que pode induz a vários processos mediados por foto-oxidação, como a morte celular (Figura 3) (Aires-Fernandes, Amantino, *et al.*, 2022; Cramer e Chen, 2020; Evangelista, 2019; Kielbik *et al.*, 2019; Vasilev *et al.*, 2020).

Figura 3 – Ilustração da aplicação da TFD por micro incisões e campo aberto durante a cirurgia de ressecção tumoral (1). Mecanismos de ação Tipo I e Tipo II da TFD ilustrados no Diagrama de Jablonski simplificado (2).



Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com

Dessa maneira, para a utilização da TFD como uma alternativa de tratamento ao GBM se faz obrigatória a utilização de fotossensibilizadores. As moléculas fotossensibilizadoras de primeira geração são aquelas oriundas de porfirinas de origem natural, como os derivados da hematoporfirina, por exemplo. Entretanto, apresentam uma limitação quanto a sua excitação em comprimentos de onda mais longos (Aires-Fernandes, Amantino, *et al.*, 2022; Aires-Fernandes, Botelho Costa, *et al.*, 2022; Cramer e Chen, 2020).

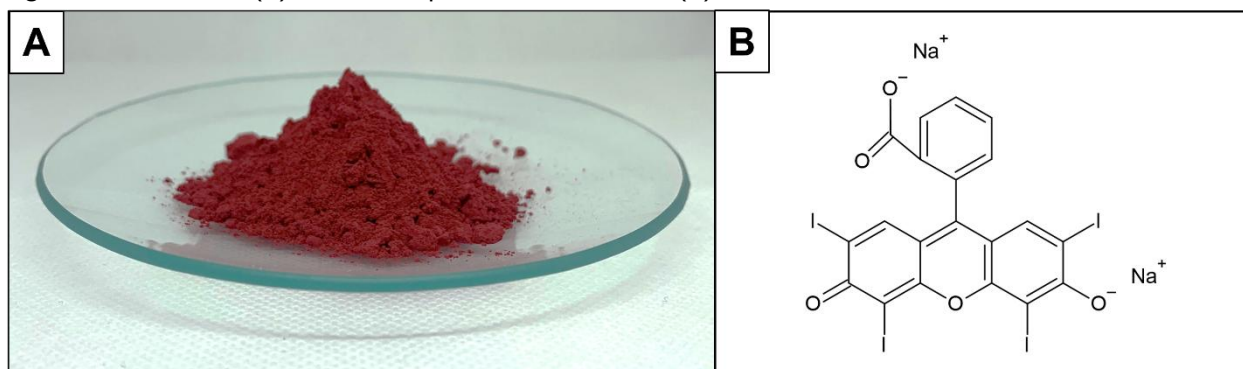
A fim de corrigir as deficiências dos fotossensibilizadores de primeira geração, foram desenvolvidas novas moléculas capazes de serem ativadas em maiores comprimentos de onda e mais potentes na geração de oxigênio singlete, como o ácido 5-aminolevulínico (5-ALA) (Gliolan®), por exemplo. Entretanto, essas novas moléculas apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, sendo um fator limitador para a sua utilização (Aires-Fernandes, Amantino, *et al.*, 2022; Aires-Fernandes, Botelho Costa, *et al.*, 2022; Cramer e Chen, 2020).

Os fotossensibilizadores de terceira geração estão sendo desenvolvidos com o objetivo de aumentar a seletividade da TFD aos tecidos-alvo reduzindo as reações adversas, além de permitir novas vias de administração. Atualmente, ainda não há nenhum fotossensibilizador de terceira geração aprovado para o uso clínico em humanos (Aires-Fernandes, Amantino, *et al.*, 2022; Aires-Fernandes, Botelho Costa, *et al.*, 2022; Cramer e Chen, 2020).

2.3 Eritrosina

A Eritrosina ($C_{20}H_{14}NaO_5$) (2-(2,4,5,7-tetraiodo-3-óxido-6-oxoxanten-9-il) benzoato-dissódico) (Figura 4) é um corante de origem natural, da classe dos xantenos, amplamente utilizado na indústria alimentícia e de produtos cosméticos (Evans, 2003; Gutiérrez e García, 1998; Vázquez-Ortega, Lagunes e Trigos, 2020). Sendo sintetizada, para fins comerciais, a partir da iodação da fluoresceína, sendo produto da reação de condensação do resorcinol e do anidrido ftálico (PubChem, 2023).

Figura 4 – Eritrosina (A); Estrutura química da Eritrosina (B).



Fonte: Própria autora, criado em ChemSketch.

Diversos estudos têm demonstrado o potencial fotossensibilizador desse corante. Bergmann e colaboradores (2021) avaliaram a capacidade de fotoativação da Eritrosina em diferentes fluidos corporais simulados e obtiveram resultados muito promissores quanto a utilização dessa substância como ativo fotossensibilizador em diferentes concentrações (Bergmann *et al.*, 2021a).

Além disso, diversos grupos de pesquisa em todo o mundo têm avaliado a eficácia e a segurança desse corante como fotossensibilizador frente a inúmeros problemas de saúde, como infecções fúngicas, bacterianas e cânceres em diferentes locais do corpo, (Costa *et al.*, 2011; Garapati *et al.*, 2015; Garg *et al.*, 2012; Gonçalves *et al.*, 2021; Hsieh *et al.*, 2022; Kanpittaya *et al.*, 2021; Luo, Zhang e Chen, 2024; Rolim *et al.*, 2012; Shi *et al.*, 2023; Vázquez-Ortega, Lagunes e Trigos, 2020; Wood *et al.*, 2006).

Em relação a utilização da Eritrosina como ativo fotossensibilizador frente ao GBM, apenas um trabalho foi encontrado após uma extensa revisão da literatura. Os autores desenvolveram uma nanopartícula de sílica funcionalizada com biotina

carregada com Eritrosina e após os ensaios de avaliação da eficácia demonstraram uma redução de cerca de 50% das células tumorais avaliadas (Silva et al., 2022a).

Entretanto, embora a Eritrosina apresente potencial como ativo fotossensibilizador e boa solubilidade em água (9 g/100 mL de água a 25°C), a sua baixa estabilidade em sistemas aquosos é um problema para a sua utilização (Groeneveld *et al.*, 2023; Snigur *et al.*, 2022).

O potencial de utilização da Eritrosina como ativo fotossensibilizador tem despertado muito interesse da indústria farmacêutica diante do direcionamento do seu uso para fins medicinais baseados principalmente em sua atividade fotodinâmica, o que a torna muito atrativa considerando o aspecto comercial visto que é um ativo obtido industrialmente há décadas, com processo bem estabelecido, além de possuir baixo custo de síntese e purificação (Evans, 2003; Gutiérrez e García, 1998; Poulsen, 1993). Estudos de segurança e eficácia que se fizerem promissores poderão contribuir diretamente para o registro e comercialização do ativo no país, tornando-o um ingrediente farmacêutico com alto valor agregado.

Em 15 de janeiro de 2025, a *Food and Drug Administration* (FDA), agência regulatória dos Estados Unidos, revogou a autorização para o uso da Eritrosina como corante em alimentos, cosméticos e medicamentos. A decisão foi baseada na Cláusula Delaney de 1960, que proíbe a utilização de aditivos com potencial carcinogênico em humanos ou animais. A revogação teve como fundamento estudos que demonstraram a formação de tumores malignos em ratos machos de laboratório expostos a altas doses de Eritrosina, devido a um mecanismo hormonal específico desses animais. No entanto, pesquisas conduzidas em outras espécies e em seres humanos não identificaram o mesmo efeito, e não há evidências de que a Eritrosina, quando utilizada nas doses recomendadas, cause câncer (FDA, 2025).

2.4 Sistemas de liberação de fármacos: Nanoemulsões

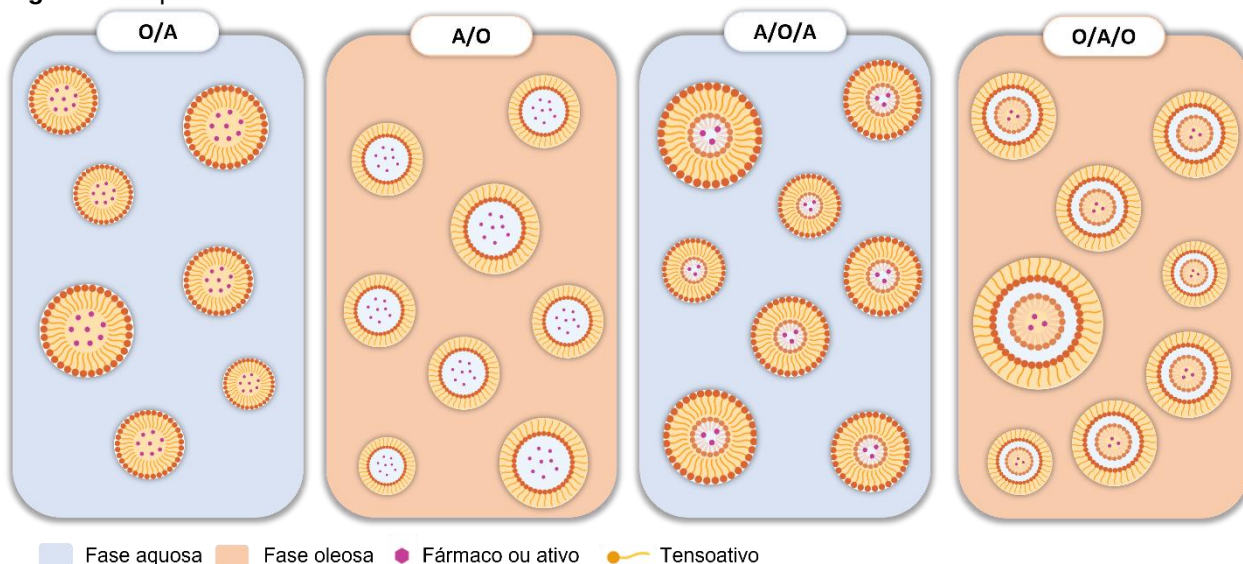
Nas últimas décadas têm sido cada vez maior e mais rápida a evolução dos sistemas de liberação de fármacos, principalmente aqueles que associam a nanotecnologia em seu desenvolvimento. Os novos sistemas de liberação têm como principal objetivo resolver ou reduzir os problemas associados aos sistemas de liberação de fármacos convencionais, como aumentar a biodisponibilidade, melhorar a solubilidade e/ou estabilidade do fármaco e, principalmente, promover uma liberação

sustentada do fármaco, permitindo aumentar o espaçamento entre a administração de doses, melhorando a adesão ao tratamento pelos pacientes e redução de eventos adversos associados a superdosagem (Khizar *et al.*, 2023; Liu *et al.*, 2021; Sahu *et al.*, 2021).

Dentre os sistemas de liberação de fármacos existentes, o desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados é uma excelente estratégia para solucionar a limitação de estabilidade e de solubilidade, em ambiente aquoso, de diversas moléculas. Além disso, pode promover melhor estabilidade físico-química e por consequência maior potencial fotodinâmico, quando utilizados ativos fotossensibilizadores para aplicação da terapia fotodinâmica (Solans *et al.*, 2005; Solans e Solé, 2012; Sousa *et al.*, 2022).

Diversos tipos de nanoformulações têm sido obtidas para encapsulação de substâncias de baixa solubilidade e/ou estabilidade em água, como nanopartículas poliméricas, nanodispersões (Yin *et al.*, 2009), lipossomas, nanosuspensões, entre outras (Bonifácio *et al.*, 2014). As nanoemulsões podem ser do tipo óleo em água (O/A), água em óleo (A/O), ou ainda nanoemulsões múltiplas, água, óleo, água (A/O/A) ou óleo, água, óleo (O/A/O), conforme ilustrado na Figura 5 (Jafari e McClements, 2018).

Figura 5 – Tipos de nanoemulsões.



Fonte: Própria autora.

As nanoemulsões são consideradas opções viáveis para encapsulação de substâncias que possuem baixa solubilidade e baixa estabilidade em água. Essa estratégia permite a obtenção de produtos aquosos e possível incremento da biodisponibilidade das substâncias ativas presentes na formulação

(Ahmed *et al.*, 2012). Elas são sistemas cineticamente estáveis, com tamanho de gotícula normalmente entre 20-200 nm e que, usualmente, apresentam aparência transparente ou translúcida (Solans *et al.*, 2005). Entretanto, alguns autores também classificam como nanoemulsões sistemas com tamanho médio de gotícula de até 500 nm (Solè *et al.*, 2012). O tamanho de gotícula diminuto, embora desejável e diretamente associado à maioria de suas vantagens, como estabilidade cinética e resistência frente à sedimentação ou cremagem (Solans *et al.*, 2005) é, também, o principal responsável pela “quebra” da nanoemulsão. Essa perda de estabilidade é, principalmente, associada à maturação de Ostwald (Gutiérrez *et al.*, 2008) (Figura 6).

Figura 6 – Tipos de instabilidade das nanoemulsões.



Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com.

A cremagem ou sedimentação é um processo em que as gotículas dispersas se unem e, por diferença de densidade, entre a fase oleosa e a fase aquosa, sobem à superfície, formando uma camada de emulsão mais concentrada semelhante a uma nata (cremagem) ou descem ao fundo, formando uma camada mais espessa (sedimentação). Esse processo é reversível e a formulação pode retornar a seu estado original por agitação leve; entretanto, não é desejável que a sua formação ocorra, pois é um sinal claro de instabilidade física (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018; Solans *et al.*, 2005). A floculação é uma união instável e reversível entre as gotículas,

formando aglomerados que se comportam como uma unidade. Sua formação ocorre quando as forças atrativas de van der Waals das gotículas são superiores às forças repulsivas que mantêm as gotículas separadas. Os floculados podem ser desfeitos por agitação leve e, assim, a formulação retorna ao seu estado original (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018; Solans *et al.*, 2005).

A coalescência é uma etapa de instabilidade posterior à floculação, quando as gotículas atraídas se fundem, formando gotículas maiores. É um processo irreversível e contínuo, que só cessa quando ocorre a separação de fases e, conseqüentemente, a quebra da emulsão (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018; Solans *et al.*, 2005).

O amadurecimento de Ostwald ocorre quando as gotículas menores diminuem e as gotículas maiores se fundem e aumentam de tamanho devido à difusão, das moléculas da fase dispersa, para a fase contínua. O amadurecimento de Ostwald pode ser inibido utilizando-se uma fase oleosa com baixa solubilidade em água ou adicionando substâncias inibidoras do amadurecimento como, por exemplo, triglicerídeos de cadeia longa, como óleo de girassol e palma (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018; Solans *et al.*, 2005).

Diferentes processos são utilizados para a preparação de nanoemulsões, normalmente divididos entre metodologias de alto aporte de energia e baixo aporte de energia. Salienta-se que, após a preparação das nanoemulsões, essas podem ser utilizadas como um modelo para obtenção de diferentes tipos de nanopartículas (lipídicas ou poliméricas), como nanoesferas ou nanocápsulas (Anton, Benoit e Saulnier, 2008). Embora essa tenha sido a finalidade principal nos primórdios do desenvolvimento de nanoemulsões, elas possuem amplo potencial para aplicação direta em produtos, como agroquímicos, medicamentos, cosméticos e alimentos (Gutiérrez *et al.*, 2008; Jafari e McClements, 2018).

As metodologias de alto aporte de energia envolvem altas forças de cisalhamento, como aquelas induzidas por homogeneizadores de alta pressão. Após a preparação de uma emulsão convencional, a fase dispersa é reduzida a gotículas diminutas em escala nanométrica (Qian e McClements, 2011). Já as metodologias de baixo aporte de energia envolvem auto-emulsificação ou inversão de fases. A auto-emulsificação baseia-se na diluição da fase externa, que induz a difusão dos componentes mais hidrofílicos da fase orgânica para a fase aquosa. Já a inversão de fases refere-se à transição de fases envolvendo inversão da curvatura do (s)

tensoativo (s) utilizado (s) ou, até mesmo, transição de estruturas contendo um filme de tensoativo com curvatura zero. A transição de fases pode ocorrer à temperatura constante e com variação da composição (PIC – do inglês *phase inversion composition method*) ou composição constante e variação da temperatura (PIT – do inglês *phase inversion temperature method*) (Almeida *et al.*, 2022; Jafari e McClements, 2018; Solans e Solé, 2012).

A otimização de nanoemulsões pode ser obtida através de propriedades relacionadas à composição e preparação. Caso seja necessário reduzir o número de variáveis, *designs* experimentais podem ser ferramentas úteis para obtenção de nanoemulsões otimizadas (Gutiérrez *et al.*, 2008; Jafari e McClements, 2018).

A caracterização das nanoemulsões pode ser realizada utilizando diversas metodologias analíticas. A avaliação do diâmetro hidrodinâmico médio de gotícula é avaliada utilizando a técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS – do inglês *dynamic light scattering*). O equipamento mede a intensidade de luz espalhada pelo movimento Browniano das gotículas e a quantidade de luz espalhada é diretamente proporcional ao tamanho das gotículas. Além disso, o DLS fornece informações de índice de polidispersão (PDI) (Grapentin, Barnert e Schubert, 2015; Jafari e McClements, 2018; Tadros *et al.*, 2004). As características morfológicas das nanoemulsões podem ser analisadas por meio de técnicas de microscopia como a microscopia eletrônica ou de força atômica (Jafari e McClements, 2018; Rao e McClements, 2010).

O índice de polidispersão (PDI) indica a variedade de populações de gotículas presentes na formulação; ou seja, quanto maior o valor de PDI, maior a variabilidade populacional. Sabe-se que, em preparações farmacêuticas, é incomum que as gotículas sejam completamente monodispersas, sendo mais comumente encontrados sistemas polidispersos; entretanto, um sistema com um baixo índice de polidispersão é um sistema mais estável e, portanto, um gráfico de dispersão monomodal é o desejável (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018).

O potencial Zeta é utilizado como um parâmetro para avaliação da estabilidade das formulações frente à floculação e é determinado observando o movimento das gotículas pela influência da corrente elétrica, através da técnica conhecida como mobilidade eletroforética (Aulton, 2016; Bhattacharjee, 2016; Jafari e McClements, 2018). Quando seu valor se encontra superior a 30 mV, em módulo, indica que as forças repulsivas da dupla camada estão atuando com maior intensidade do que as

forças atrativas de Van der Waals; assim, há menor tendência à formação de floculado e, conseqüentemente, menor possibilidade de ocorrer coalescência e quebra da emulsão (Aulton, 2016; Bhattacharjee, 2016; Friberg, Jansson e Cederberg, 1976; Jafari e McClements, 2018; Mahdi *et al.*, 2011).

Nesse contexto, o desenvolvimento de sistemas nanoemulsionados, usando metodologia de baixo aporte de energia, contendo Eritrosina, como fotossensibilizador, para aplicação em terapia fotodinâmica no tratamento de Glioblastoma é uma estratégia inovadora, como alternativa ou ação complementar de tratamento a essa doença.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver e caracterizar sistemas nanoemulsionados contendo Eritrosina para potencial aplicação em terapia fotodinâmica no tratamento de glioblastoma.

3.2 Objetivos específicos

- Desenvolver e validar metodologia analítica de quantificação da Eritrosina por espectrofotometria de absorção;
- Desenvolver os sistemas nanoemulsionados;
- Realizar a caracterização fotofísica, físico-química e estrutural das nanoemulsões;
- Avaliar a internalização celular;
- Avaliar a atividade citotóxica das nanoemulsões *in vitro* em cultura celular 2D com a linhagem celular HDFn;
- Avaliar a eficácia baseada na atividade fotodinâmica das nanoemulsões *in vitro* em cultura celular 2D com a linhagem celular T98-G.

MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para melhor visualização de todas as etapas da metodologia e estratégia investigativa, consulte o fluxograma disponível no Apêndice.

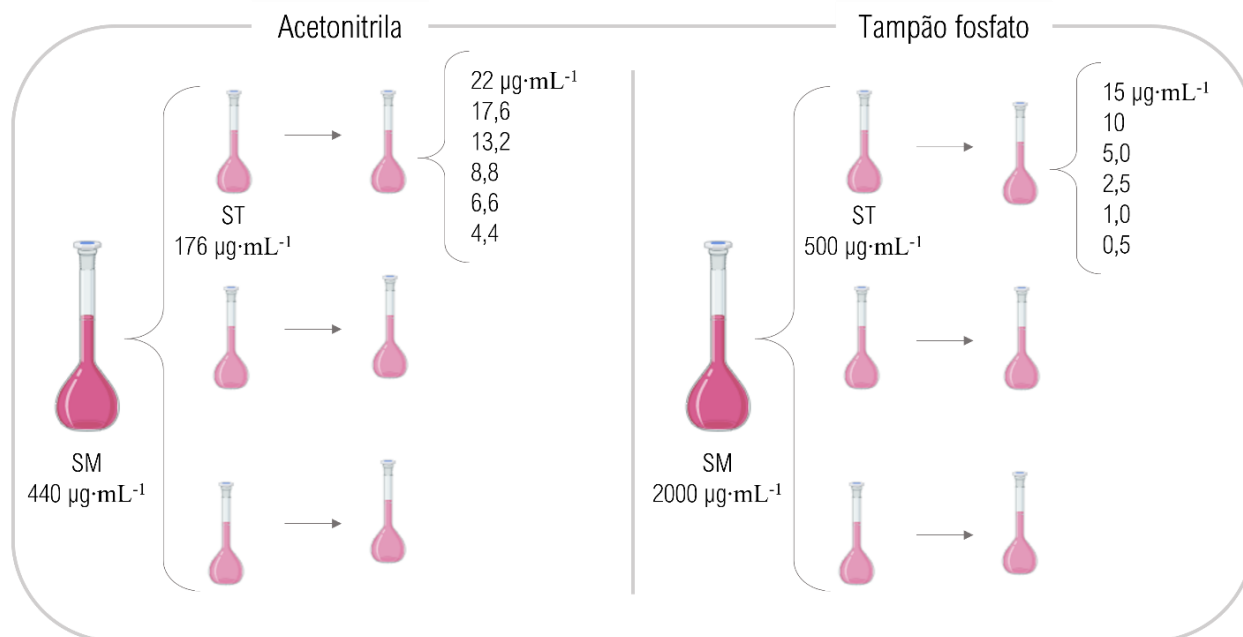
4.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de quantificação da Eritrosina por espectrofotometria de absorção no UV-Vis

Para o desenvolvimento e validação da metodologia analítica foram utilizados os critérios descritos na RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Foi realizada a validação para a metodologia analítica de quantificação da Eritrosina em espectrofotômetro UV-Vis. Foram avaliados os parâmetros de linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão, exatidão e robustez utilizando os solventes acetonitrila e solução tampão fosfato com pH 7,4 (Brasil, 2017).

4.1.1 Linearidade

Para a determinação da linearidade foram preparadas seis concentrações de Eritrosina em acetonitrila e em solução tampão fosfato com pH 7,4 (Figura 7), em triplicata, a partir de três soluções de trabalho (ST), oriundas da solução mãe (SM).

Figura 7 – Esquema ilustrativo do preparo das soluções de Eritrosina em acetonitrila e solução tampão fosfato pH 7,4 usadas para a determinação da linearidade.



Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com

Após o preparo das soluções, as absorvâncias foram medidas usando um espectrofotômetro UV-Vis, modelo Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific), em 530 nm para acetonitrila e 525 nm para solução tampão fosfato, usando uma cubeta de quartzo. Em seguida, os dados obtidos foram plotados em um gráfico da concentração *versus* a absorvância e gerada a equação da reta de regressão. Além disso, foi avaliado o gráfico de dispersão dos resíduos, acompanhado da avaliação estatística dos resultados obtidos (Brasil, 2017).

4.1.2 Precisão

A precisão do método analítico foi avaliada através da repetibilidade e da precisão intermediária com dois analistas distintos em dias diferentes de análise. Para isso, foram preparadas três soluções de Eritrosina em acetonitrila e em solução tampão fosfato, contemplando o intervalo linear do método, com alta, média e baixa concentração. As soluções foram preparadas a partir de diluições de três soluções de trabalho, oriundas da solução mãe.

A precisão foi determinada a partir da dispersão dos resultados, com base no valor do desvio padrão relativo (DPR) (Brasil, 2017). O desvio padrão relativo foi calculado segundo a Equação 1.

$$\text{DPR} = \left(\frac{\text{DP}}{\text{CMD}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde, **DP** corresponde ao valor do desvio padrão e **CMD** a concentração média determinada a partir da equação da reta.

4.1.3 Exatidão

A exatidão do método analítico foi determinada a partir da análise de três concentrações de Eritrosina em acetonitrila e em solução tampão fosfato, contemplando o intervalo linear do método, com alta, média e baixa concentração. As soluções foram preparadas a partir da diluição da solução mãe (Brasil, 2017). Em seguida, a exatidão foi calculada a partir da Equação 2.

$$\text{Exatidão} = \left(\frac{\text{CMD}}{\text{CT}} \right) \times 100 \quad (2)$$

Onde, **CMD** corresponde a concentração média determinada e **CT** a concentração teórica.

4.1.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram determinados baseados nos parâmetros das curvas analíticas utilizando as Equações 3 e 4, respectivamente.

$$\text{LD} = \frac{3,3 \times \sigma}{\text{IC}} \quad (3)$$

$$\text{LQ} = \frac{10 \times \sigma}{\text{IC}} \quad (4)$$

Onde, σ corresponde ao desvio padrão do intercepto com o eixo y e **IC** corresponde a inclinação da curva analítica.

4.1.5 Robustez

A fim de se avaliar a robustez do método foram modificadas a marca do fabricante da acetonitrila e o volume da cubeta de quartzo utilizada na análise. Para a análise da robustez utilizando solução tampão fosfato, foi feita a substituição do equipamento utilizado na análise das absorbâncias além da alteração do volume da cubeta de quartzo. Em seguida, foram preparadas três concentrações de Eritrosina, contemplando o intervalo linear do método, com alta, média e baixa concentração. As soluções foram preparadas a partir da diluição da solução mãe (Brasil, 2017). Após as análises, foi calculado o desvio padrão relativo das amostras utilizando a Equação 1, citada anteriormente.

4.2 Obtenção dos sistemas nanoemulsionados

4.2.1 Avaliação da solubilidade da Eritrosina em diferentes matérias-primas

A avaliação da solubilidade da Eritrosina foi realizada segundo a metodologia descrita no primeiro volume da sexta edição da Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2019a). Foi avaliada a solubilidade da Eritrosina na presença das matérias-primas: miristato de isopropila, óleo de soja e Crodamol™ GTCC.

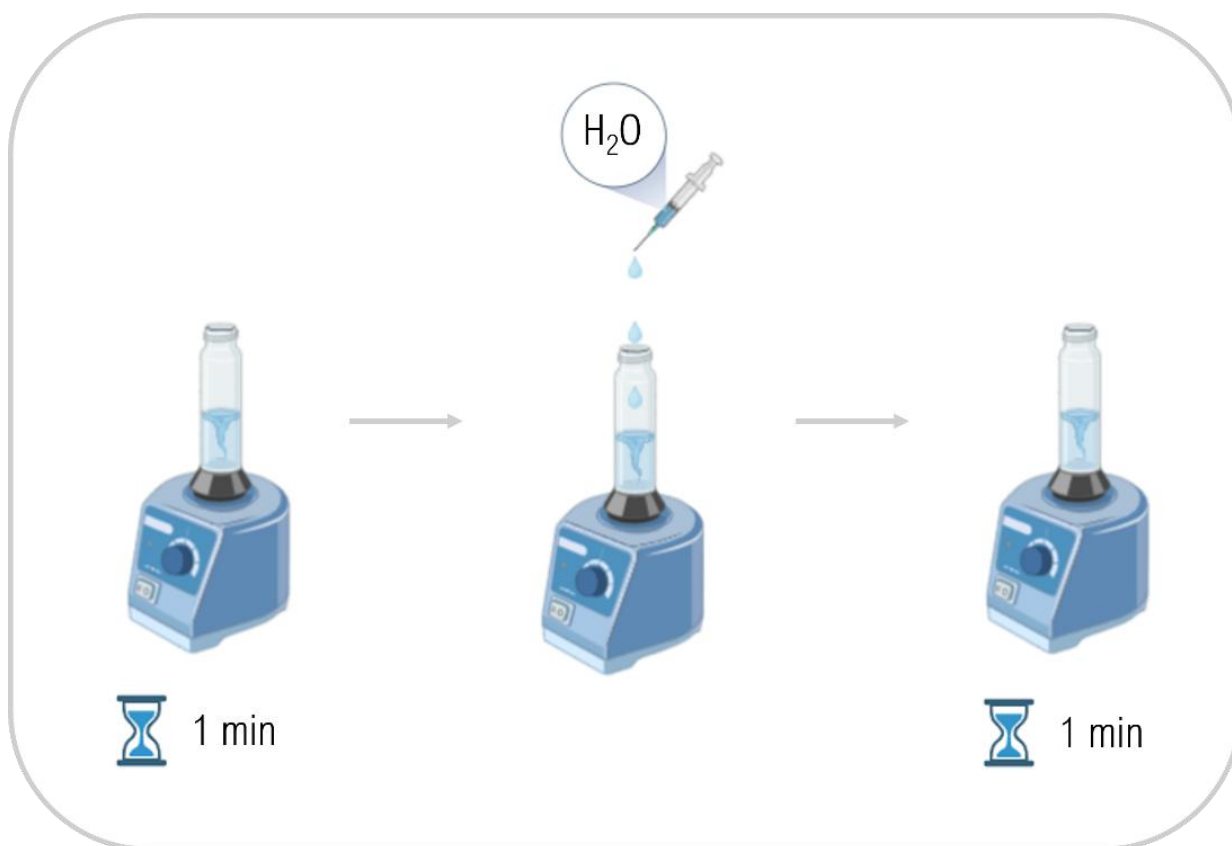
Uma parte de Eritrosina foi adicionada a tubos de ensaio e, em seguida, partes das matérias-primas foram adicionadas aos tubos. Após cada parte adicionada, os tubos foram agitados, em agitador do tipo vórtex, por 1 min e, em seguida, deixados em repouso, por 24 h, para posterior análise da solubilidade (Brasil, 2019a).

4.2.2 Síntese da nanoemulsão

Para a síntese das formulações, foi utilizada metodologia de baixo aporte de energia de inversão de fases por composição e preparadas nanoemulsões (NEs) do tipo óleo em água. Para formulações sem fotossensibilizador foi utilizada a composição de 5% (p/p) de lipídio, 5% (p/p) de mistura de tensoativos e 90% (p/p) de água ultrapura. Para as demais formulações, o fotossensibilizador foi incorporado ao lipídio e o percentual adicionado descontado da fase aquosa.

Inicialmente, o lipídio e os tensoativos foram homogeneizados por 1 min, em agitador do tipo vórtex (2800 rpm). Após a homogeneização, a água ultrapura foi gotejada, lentamente, com o auxílio de uma seringa, sob agitação constante, também em agitador do tipo vórtex. Após a completa adição da água, a formulação foi homogeneizada por mais 1 min e, em seguida, deixada em repouso por 24 h para posterior análise macroscópica de estabilidade (Figura 8) (Almeida *et al.*, 2022), avaliando a possível formação de cremagem, floculação, coalescência, precipitação e separação de fases (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018; Solans *et al.*, 2005).

Figura 8 – Esquema ilustrativo de síntese das nanoemulsões pelo método de baixo aporte energético.



Fonte: Própria autora, criado em Biorender.com.

4.2.3 Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação

Foram avaliados diferentes pares de tensoativos não iônicos, a fim de se determinar o par que confere melhor estabilidade ao sistema nanoemulsionado (Almeida *et al.*, 2022). Foram avaliados os tensoativos: polissorbato 20 (EHL 16,7), polissorbato 80 (EHL 15), monolaurato de sorbitano (EHL 9,0), oleth-3 (EHL 6,6),

monooleato de sorbitano (EHL 4,3) e trioleato de sorbitano (EHL 1,8) utilizando a mesma proporção descrita em 4.2.2. A quantidade utilizada de cada tensoativo foi calculada a partir da Equação 5.

$$EHL_r = \frac{EHL_A \times A\% + EHL_B \times B\%}{100} \quad (5)$$

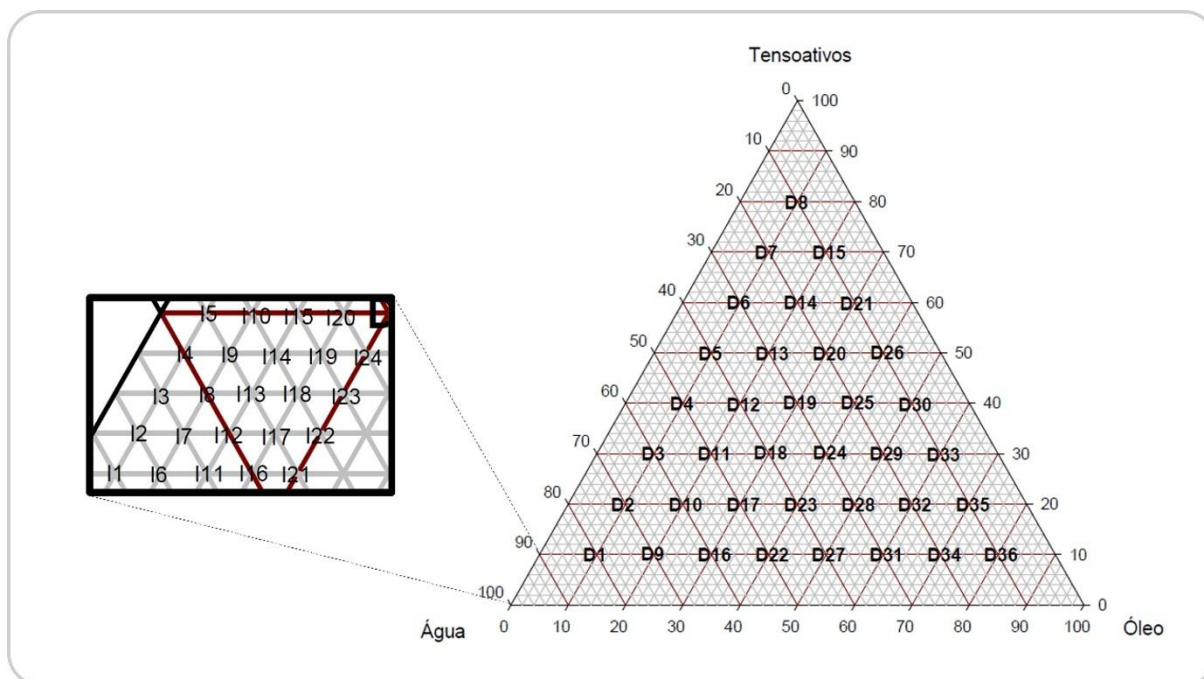
Onde, **EHL_r** é o valor de EHL resultante da mistura de dois tensoativos, **EHL_A** é o valor de EHL do tensoativo mais hidrofóbico, **EHL_B** é o valor de EHL do tensoativo mais, hidrofílico, **A%** é o percentual do tensoativo mais hidrofóbico e **B%** é o percentual do tensoativo mais hidrofílico.

Após a síntese, as formulações foram deixadas 24 h em repouso para avaliação macroscópica dos parâmetros de estabilidade, como formação de cremagem, floculação, coalescência, precipitação e separação de fases (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018; Solans *et al.*, 2005).

4.2.4 Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário

O diagrama de fases pseudoternário foi construído posicionando a água, os pares de tensoativos, previamente determinados, e o lipídio em cada um dos vértices do triângulo e o percentual de cada componente variando de 0 a 100, a cada 10%, ao longo de cada lado do triângulo (Almeida *et al.*, 2022; Barreto *et al.*, 2017; Jafari e McClements, 2018).

Foram preparadas 36 formulações, correspondentes aos pontos principais do diagrama, para a determinação da região de formação das nanoemulsões. Em seguida, foram preparadas mais 24 formulações dentro da região de formação de nanoemulsões com o objetivo de se obter formulações com maior percentual de água e melhor estabilidade (Figura 9) (Almeida *et al.*, 2022; Barreto *et al.*, 2017).

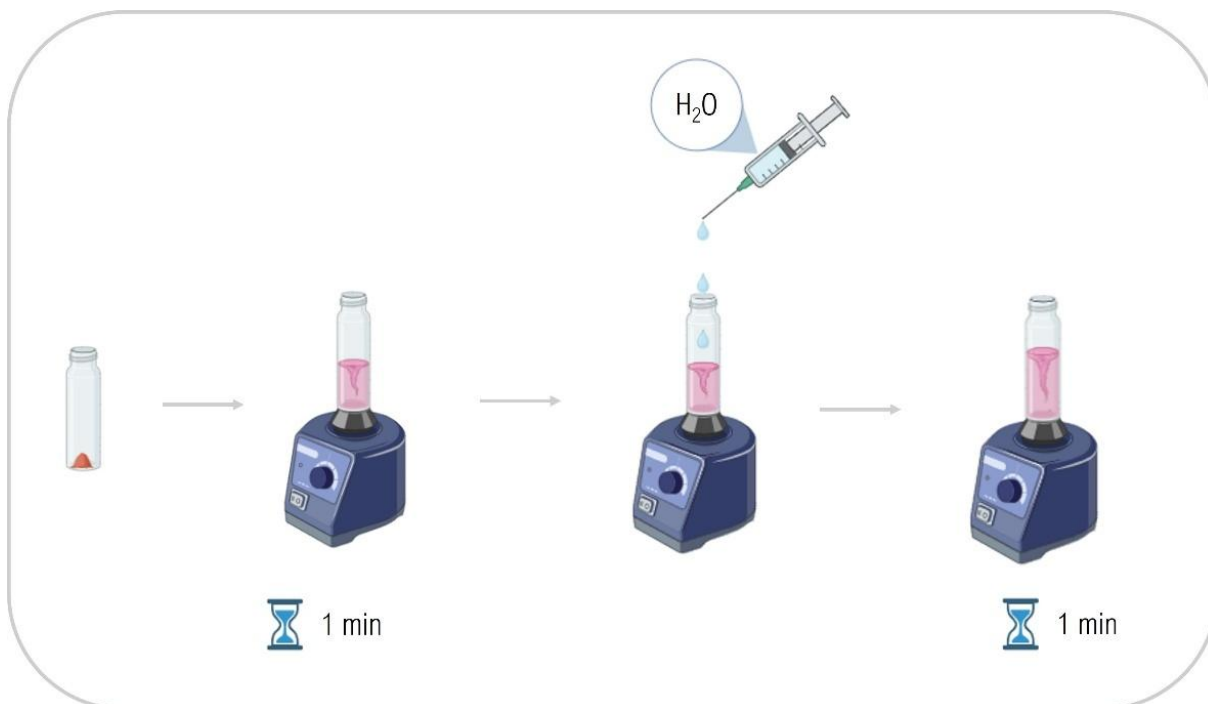
Figura 9 – Diagrama de fases pseudoternário.

Fonte: Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0.

4.2.5 Incorporação da Eritrosina nas nanoemulsões

Após a determinação do melhor par de tensoativos e da melhor composição percentual dos componentes da nanoemulsão, foi realizada a incorporação da Eritrosina ao sistema nanoemulsionado.

Foram avaliadas três diferentes concentrações de Eritrosina 0,01; 0,05 e 0,1 mg·mL⁻¹. Para isso, a Eritrosina foi pesada e, em seguida, incorporada à fase oleosa da nanoemulsão e homogeneizada por 1 min, em agitador do tipo vórtex. Após a homogeneização, a água ultrapura foi gotejada, lentamente, com o auxílio de uma seringa, sob agitação constante, também em agitador do tipo vórtex. Após a completa adição da água, a formulação foi homogeneizada por mais 1 min e, em seguida, deixada em repouso por 24 h para posterior análise macroscópica de estabilidade (Figura 10).

Figura 10 – Esquema ilustrativo de síntese das nanoemulsões dando ênfase na adição de Eritrosina.

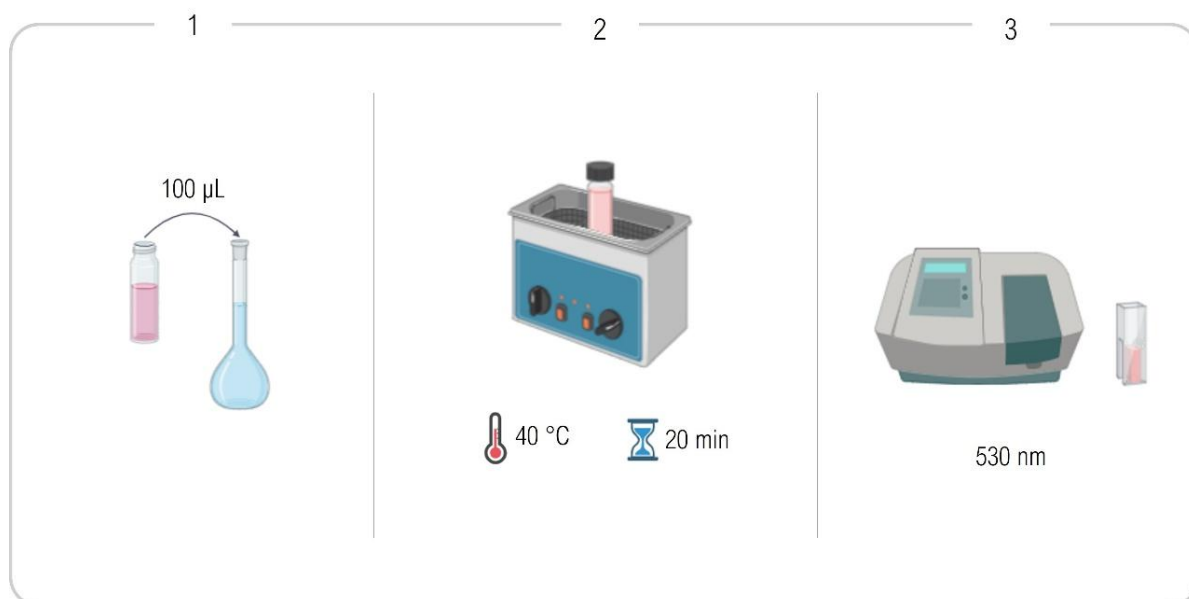
Fonte: Própria autora, criado em Biorender.com.

4.2.6 Doseamento do teor de Eritrosina nas nanoemulsões

Para a determinação do teor de Eritrosina presente no sistema nanoemulsionado, foi realizada a digestão das nanoestruturas e, em seguida, a quantificação do teor de Eritrosina presente na dispersão através da curva analítica em acetonitrila (4.1.1). Essa análise permite determinar a quantidade real do ativo fotossensibilizador incorporado a NE, levando em consideração as perdas durante o processo experimental de síntese da formulação.

Para isso, foi feita a adição de 100 μ L de NEE em um balão volumétrico de 5 mL contendo acetonitrila grau analítico. Após completa homogeneização, a solução foi transferida para um frasco de vidro contendo tampa e levada ao banho ultrassônico à 40°C por 20 min. Em seguida, foi realizada a leitura da amostra em espectrofotômetro a 530 nm (Figura 11) (Primo, 2009).

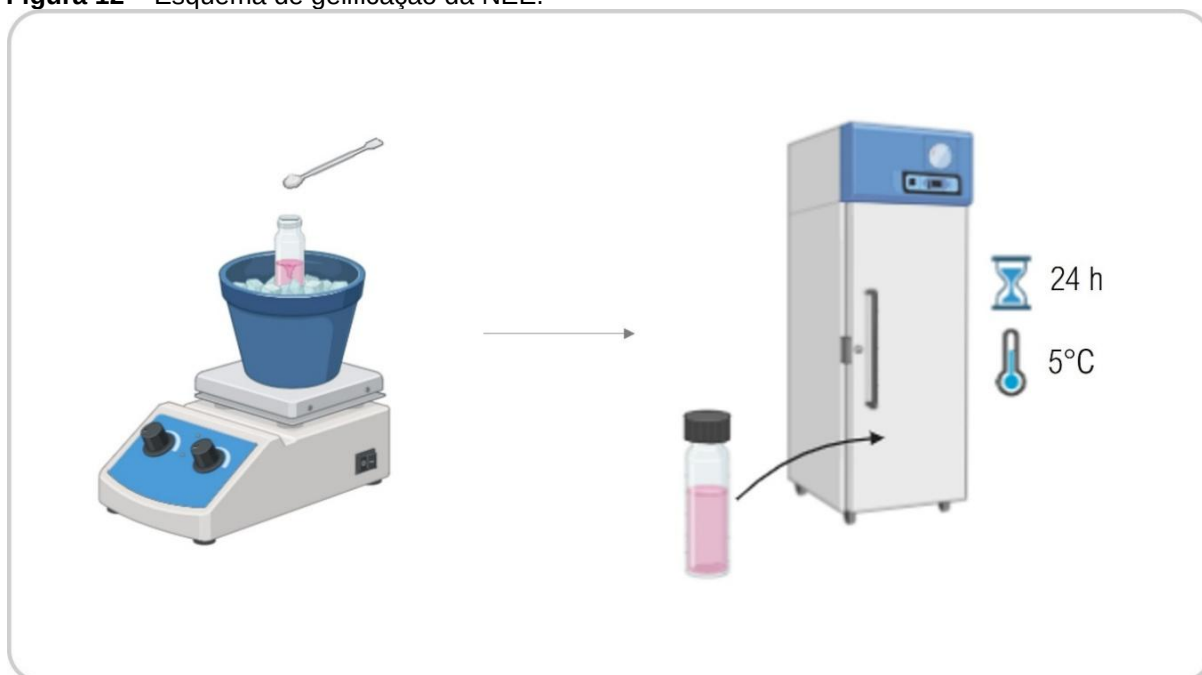
Figura 11 – Esquema ilustrativo das etapas para determinação da eficiência de associação da Eritrosina nas nanoemulsões.



Fonte: Própria autora, criado em Biorender.com.

4.2.7 Gelificação das nanoemulsões

A fim de se aumentar a viscosidade da nanoemulsão, visando otimizar a aplicação clínica da formulação e permitir a realização do ensaio de determinação do perfil de liberação *in vitro* da Eritrosina da nanoemulsão, foi realizada a gelificação das NEs. Para isso, foi realizada a incorporação de 23% do tensoativo não-iônico sintético Pluronic® F-127 à NEE, em banho de gelo, sob agitação magnética (Ganguly *et al.*, 2022). Em seguida, a formulação foi levada ao refrigerador por 24 h (Figura 12).

Figura 12 – Esquema de gelificação da NEE.

Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com.

4.3 Caracterização fotofísica

4.3.1 Determinação do perfil de absorção e de emissão de fluorescência no UV/Vis por espectrofotometria da Eritrosina livre e em nanoemulsão

Os espectros de absorção da Eritrosina foram medidos usando um espectrofotômetro UV-Vis, modelo Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific), com uma faixa de 380-650 nm, usando uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico. Os espectros de emissão de fluorescência foram medidos usando um espectrofluorímetro, modelo RF-6000 (Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto, Japão), com excitação em 500 nm, faixa de aquisição de 525-700 nm e fendas de resolução espectral de 10 nm para excitação e emissão respectivamente (Amaral, *do et al.*, 2022).

4.3.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão

Para a determinação do rendimento quântico de fluorescência (Φ_f) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão, após digestão em acetonitrila, foi utilizada a metodologia descrita por (Zhang, Zhang e Liu, 2014).

Foram preparadas duas soluções de Eritrosina em diferentes ambientes químicos e uma solução de Eritrosina em nanoemulsão. A solução de Eritrosina preparada utilizando etanol absoluto e 0,01 mol·L⁻¹ de NaOH foi utilizada como uma solução referência ($\Phi_f = 0,14$) conforme determinado previamente por Zhang, Zhang e Liu, 2014, e a solução de Eritrosina livre, em acetonitrila (ACN), foi utilizada como primeira amostra. Além disso, a segunda amostra (nanoemulsão contendo Eritrosina), foi obtida após a formulação ser submetida ao processo de digestão do sistema nanoestruturado em ACN. Esse processo foi realizado através da submissão da nanoemulsão, na presença de ACN, em banho ultrassônico por 20 min, permitindo, dessa maneira, o retorno da Eritrosina para o ambiente orgânico.

Após o preparo das soluções, as amostras foram avaliadas em espectrofotômetro UV-Vis modelo Genesys 10S (Thermo Fisher Scientific), em uma faixa de 350-750 nm, usando uma cubeta de quartzo, a fim de se determinar o comprimento de onda máximo de absorção com densidade óptica de 0,1, seguindo o protocolo definido por (Eaton, 1988). Em seguida, as amostras foram avaliadas em espectrofluorímetro modelo RF-6000 (Shimadzu Corporation, Nakagyo-ku, Kyoto, Japão), com excitação no mesmo comprimento de onda determinado na varredura UV-Vis.

Em seguida, os rendimentos quânticos de fluorescência foram calculados usando a Equação 7, conforme o método relativo descrito por (Eaton, 1988).

$$\Phi_f = \Phi_f^r \times \frac{F_a}{F_r} \times \frac{A_r}{A_a} \times \frac{n_a^2}{n_r^2} \quad (7)$$

Onde, Φ_f corresponde ao rendimento quântico de fluorescência, **F** corresponde a integração da área da banda de emissão de fluorescência corrigida, **A** corresponde a absorbância no comprimento de onda de excitação e **n** corresponde ao índice de

refração do solvente utilizado. O subscrito **r** se refere a referência e o subscrito **a** se refere a amostra.

4.3.3 Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão

Para a determinação do tempo de vida de fluorescência (τ) da Eritrosina livre e em nanoemulsão foi utilizado o equipamento *Lifetime Fluorescence Spectrometer (EasyLife X, HORIBA Scientific)* com LED pulsado de excitação de 525 nm. A qualidade das análises foi avaliada pela distribuição residual dos dados e pelo parâmetro chi-quadrado (χ^2). O tempo de vida de fluorescência foi determinado pelo software do próprio equipamento. Para isso, foi preparada uma solução de Eritrosina em água ultrapura ($0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) e a NEE foi analisada sem diluição. Foram utilizados 2 mL de cada amostra acondicionadas em cubetas de fluorescência de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico.

4.4 Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões

4.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio por espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta por mobilidade eletroforética

As nanoemulsões foram caracterizadas pela técnica de espalhamento dinâmico da luz e mobilidade eletroforética utilizando o equipamento Zetasizer Nano ZS – Malvern, UK. Foram avaliados os tamanhos de gotícula, índice de polidispersão e potencial Zeta. Cada análise foi realizada após a diluição das formulações em água ultrapura na proporção de 1:50 (Almeida *et al.*, 2022; Jesus *et al.*, 2017). As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados expressos como média $\pm$ desvio padrão. Os gráficos de distribuição do tamanho de gotícula, por intensidade populacional, foram obtidos no *software* do próprio equipamento (Zetasizer software – Malvern).

4.4.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A NEE foi avaliada pela técnica de análise de rastreio de nanopartículas (NTA) utilizando o equipamento NanoSight NS300 (Malvern Instruments®) equipado com um

laser verde (532 nm), uma câmera sCMOS e uma bomba de seringa. As amostras foram diluídas em água ultrapura para obter uma concentração entre 1×10^2 e 1×10^8 partículas/mL e injetadas com seringas estéreis (1000 μ L) na câmara de amostras.

Foram registrados cinco vídeos de 60 segundos por amostra e analisados com o software NTA 3.2 (Malvern Instruments®). Cada medição foi efetuada em triplicata e os dados foram expressos como a média $\pm$ desvio padrão (Foreman-Ortiz *et al.*, 2022).

4.4.3 Estudo de estabilidade

4.4.3.1 Influência de diferentes condições de estresse em função do tempo

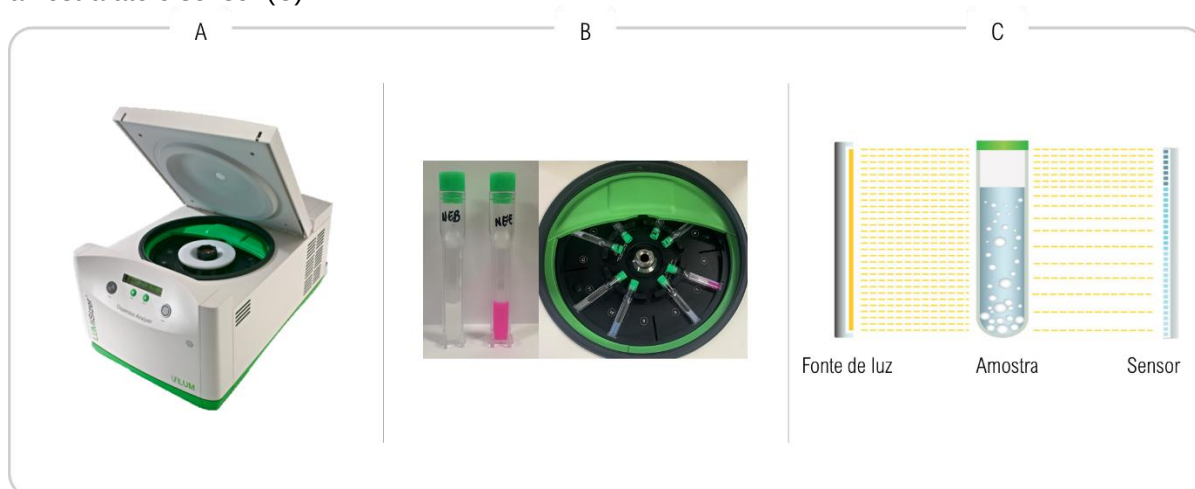
A fim de se avaliar a influência de diferentes condições de estresse sobre a estabilidade da NEE em função do tempo, foram preparadas três formulações, e acondicionadas em frasco de vidro com tampa, envolto em papel alumínio. Em seguida, cada formulação foi armazenada sob uma condição de estresse: refrigerador ($5 \pm 2^\circ\text{C}$), estufa ($37 \pm 2^\circ\text{C}$) e temperatura ambiente, sem controle de temperatura.

As formulações foram armazenadas por 90 dias, em cada uma das condições de estresse, e foram avaliadas quanto a variação do tamanho de gotículas, índice de polidispersão, potencial Zeta, concentração de partículas/mL, índice spam e teor de associação do ativo fotossensibilizador, após 24h de síntese da formulação e após 90 dias conforme descrito em (Brasil, 2019b).

4.4.3.2 Estudo de estabilidade de longa duração por centrifugação analítica

O estudo de estabilidade de longa duração por centrifugação analítica permite estimar o tempo de prateleira das nanoemulsões. As medidas foram realizadas no equipamento LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha) (Figura 13). Este equipamento utiliza a tecnologia STEP™ Technology (do inglês, *Space and Time-resolved Extinction Profiles*) para medir a luz transmitida em função do tempo e da posição das gotículas durante a centrifugação analítica da amostra. Essa tecnologia utiliza um transmissor e um receptor de infravermelho próximo (*near infrared – NIR*), capaz de registrar espectros de transmissão de NIR, além disso, a centrifugação, permite simular o fenômeno de migração das gotículas que ocorrem durante o armazenamento das formulações.

Figura 13 - Esquema ilustrativo do equipamento LUMiSizer® (A); Amostras alocadas nas cubetas e afixadas no rotor do equipamento (B); Ilustração esquemática da incidência da luz *NIR* através da amostra até o sensor (C).



Fonte: Própria autora, adaptado de www.lum-gmbh.com.

Para estimar o tempo de prateleira (*shelf life*) de 12 meses, foram utilizados 400 µL de amostra (NEB e NEE) que foram alocadas em cubetas e centrifugadas a 3440 rpm e 25°C por 6 h. O *shelf life* foi calculado segundo a Equação 6 (GmbH, 2025).

$$shelf\ life = tm_{Requerido} \times RCF \quad (6)$$

Onde, **tm_{Requerido}** é o tempo total de coleta de dados de cada análise, em segundos, e **RCF** (*relative centrifugal force*) é a força centrífuga relativa. Para converter o *shelf life* de segundos para meses, dividiu-se o tempo encontrado em segundo por 3600 (1 h) x 24 (1 dia) x 30 (1 mês).

4.4.4 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância atenuada (FTIR-ATR)

Para avaliar a eficiência da encapsulação da Eritrosina na nanoemulsão e caracterizar estruturalmente o sistema, foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância atenuada (FTIR-ATR) (Bruker Company, Modelo ALPHA, EUA) utilizando a faixa de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

Para a caracterização topográfica das NEs foram realizadas análises de Microscopia de Força Atômica (AFM). Para isso, foi utilizado um microscópio de força atômica Bruker® MultiMode8 no modo *Peak Force Tapping*®. Para a varredura, foi utilizada uma sonda Bruker® SCANASYST-AIR com uma constante de mola nominal de 0,4 N/m e um raio de ponta de 2,0 nm. A plataforma AFM foi montada em uma câmara ambiental, com controle de umidade relativa e de temperatura (10% e 25°C).

4.4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

4.4.6.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM)

Para a caracterização estrutural, as NEs foram analisadas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM), utilizando microscópio eletrônico de transmissão FEI Tecnai G² F20 com voltagem de aceleração de 200 kV (FEI Company, EUA). As amostras foram depositadas em grades revestidas com carbono de 300 mesh e deixadas em repouso até completa secagem e formação de um filme sobre a superfície das grades. Não foram utilizados qualquer tratamento prévio nas amostras ou utilização de aditivos para contraste ou marcação.

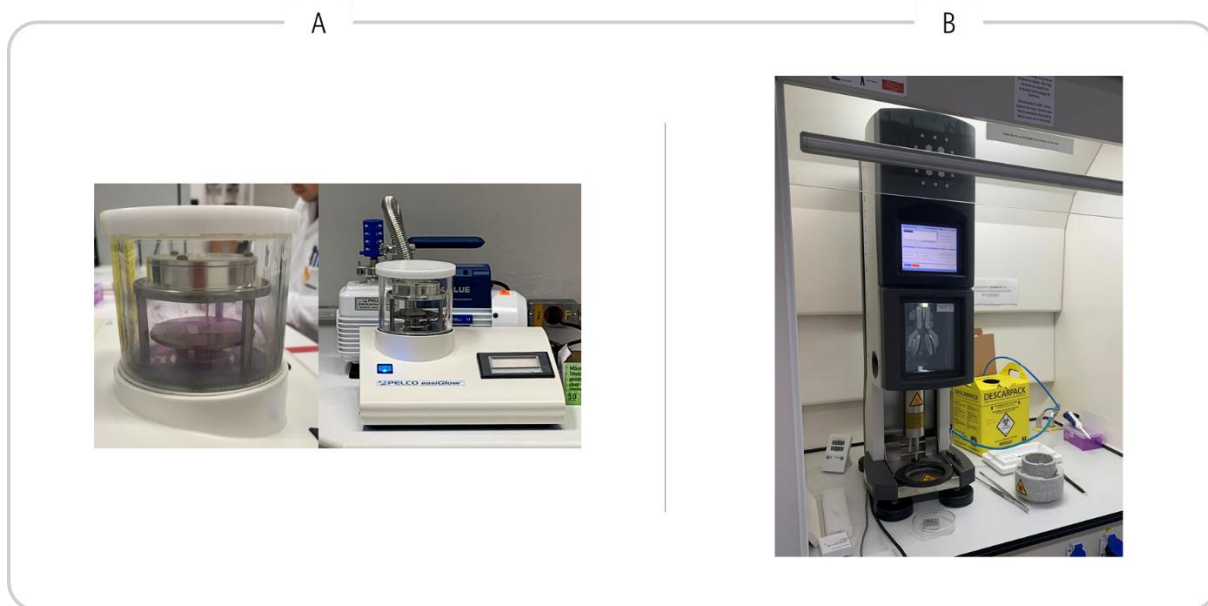
4.4.6.2 Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)

Para a caracterização estrutural, as NEs foram analisadas por Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM), técnica que permite a observação das gotículas do sistema como se ainda estivessem em suspensão. Para isso, foi utilizado um microscópio eletrônico de transmissão JEM 1400 Plus (JEOL, EUA), com canhão de elétrons LaB6 e voltagem de aceleração de 120 kV.

As amostras foram preparadas de acordo com os seguintes passos: inicialmente, as grades revestidas com carbono de 300 mesh foram tratadas com uma descarga incandescente para aumentar a sua hidrofiliabilidade. Para este procedimento, foi utilizado um sistema de descarga *Pelco easiGlow* (Ted Pella, EUA). Em seguida, foi utilizado um sistema de vitrificação automatizado para a preparação das amostras (*Vitrobot Mark IV System*, Thermo Scientific, EUA) (Figura 14). As amostras (3 µL)

foram depositadas sobre a grade hidrofílica e, em seguida, foram mergulhadas em etano liquefeito, para que as amostras passassem para o estado vítreo instantaneamente, minimizando a ocorrência de formação de cristais de gelo. Então, as amostras foram analisadas no microscópio eletrônico de transmissão com tensão de 120 kV e modo MDS de análise.

Figura 14 - Foto dos equipamentos *Pelco easiGlow* (A) e *Vitrobot Mark IV System* (B).

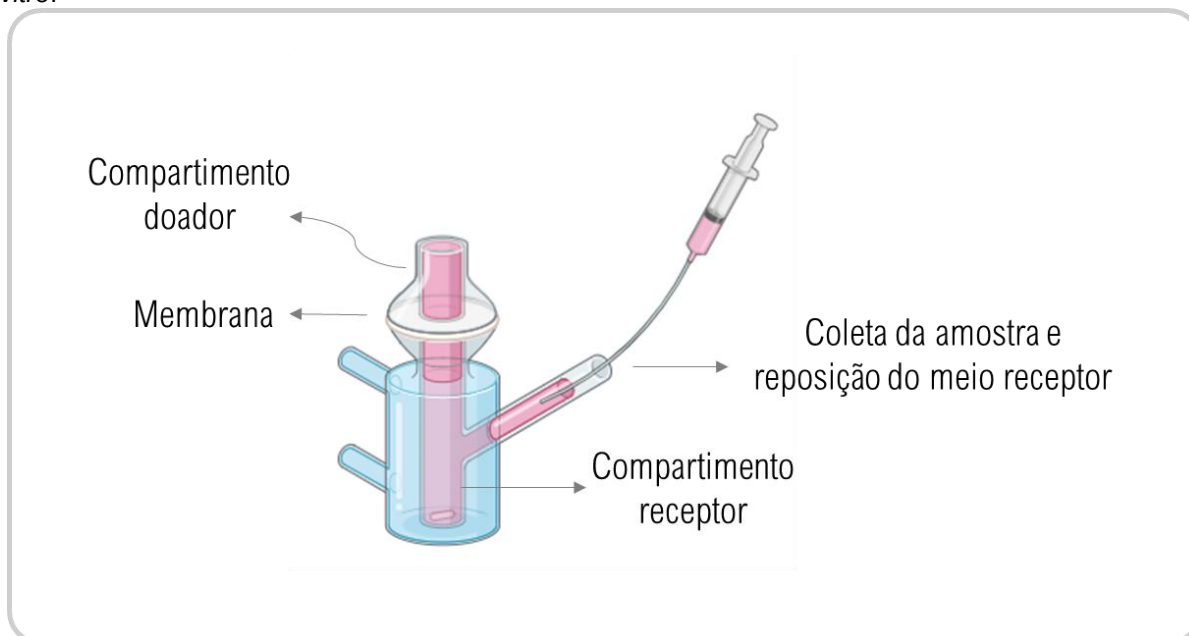


Fonte: Própria autora.

4.4.7 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da Eritrosina da nanoemulsão gelificada em células de Franz

Para determinar o perfil de liberação da Eritrosina da nanoemulsão gelificada (NEEGel) foi utilizado o aparato de células de Franz (Aparatus 8 USP) (Figura 15).

Figura 15 – Desenho esquemático do aparato de célula de Franz utilizado no ensaio de liberação *in vitro*.



Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com.

A célula de Franz foi totalmente preenchida com 7,0 mL de meio receptor (tampão fosfato pH 7,4). Em seguida, foram aplicados 300 µL das amostras, NEEGel ou solução de Eritrosina em água (0,1 mg·mL⁻¹), no compartimento doador, sobre uma membrana hidrofílica em difluoreto de polivinilideno (PVDF) com 0,22 µm de poro (GVS, EUA). As amostras provenientes da liberação da Eritrosina da NEEGel, foram coletadas a cada 10 minutos durante a primeira hora do ensaio, em seguida, as coletas foram realizadas a cada 2 h. Para a Eritrosina livre, as coletas também foram realizadas a cada 10 minutos na primeira hora de ensaio, seguido de coletas a cada 1 h. Imediatamente após a retirada de 1 mL de amostra, o volume do meio receptor tampão fosfato era repostado. O sistema foi mantido sob ambiente climatizado e protegido da luz, com temperatura (37 ± 0,5°C) e agitação constante.

As amostras coletadas foram analisadas em espectrofotômetro a 525 nm, para quantificação da Eritrosina liberada no meio receptor. A quantidade de Eritrosina liberada durante o ensaio foi determinada com base na Equação 8.

$$Q_{\text{real},t} = (C_{\text{mensurada},t} \times V_r) + (V_a \times \sum_{Ca}^{n-1}) \quad (8)$$

Onde, $Q_{\text{real},t}$ corresponde a quantidade liberada no tempo t ; $C_{\text{mensurada},t}$ corresponde a concentração mensurada no tempo t , a partir da equação da reta do

método validado; V_r corresponde ao volume da célula de difusão; V_a corresponde ao volume de amostra removida; C_a corresponde a concentração de amostra removida.

Os dados obtidos foram plotados em um gráfico da quantidade de Eritrosina liberada (%) em função do tempo (horas). Em seguida, foi feita a determinação do modelo matemático que melhor descreve o perfil de liberação obtido e, sugere, o mecanismo de liberação mais provável do sistema. Os modelos foram calculados utilizando o suplemento do Excel DDSolver 1.0. Foram avaliados os modelos de ordem zero, primeira ordem, Higuchi, Hixon-Crowell e Korsmeyer-Peppas.

4.4.8 Reologia da nanoemulsão gelificada

A análise de fluxo da NEEG foi realizada em um reômetro rotativo Discovery HDR-1 (T.A. Instruments, EUA), utilizando a geometria cone-placa. Foi colocada uma quantidade de amostra na placa inferior e a geometria superior foi baixada de modo a tocar a amostra, deixando um espaço entre as geometrias de 0,5 mm. As curvas foram geradas a uma temperatura constante de 37°C e utilizando uma taxa de cisalhamento de 0,01 a 100,0 $1 \cdot s^{-1}$ (ascendente) e de 100,0 a 0,01 $1 \cdot s^{-1}$ (descendente).

Para a análise oscilatória da NEEGel, inicialmente foi realizada a determinação da sua região viscoelástica linear a 37°C. A análise de frequência foi realizada na faixa de frequências de 0,1 até 16 Hz, a uma tensão constante de 1,0 Pa.

4.4.9 Análise do perfil de textura (TPA) da nanoemulsão gelificada

A análise do perfil de textura da amostra NEEGel foi realizada utilizando o analisador de textura TA.XTplus (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) com uma sonda analítica cilíndrica ($\varnothing = 10$ mm). As amostras foram posicionadas centralizadas abaixo da sonda que foi abaixada a uma velocidade constante de 0,5 $mm \cdot s^{-1}$. Após comprimir a amostra até uma profundidade de 10 mm, a sonda foi levantada a uma velocidade constante de 0,5 $mm \cdot s^{-1}$ e, após 5 s em repouso, foi iniciado um novo ciclo de compressão sob as mesmas condições.

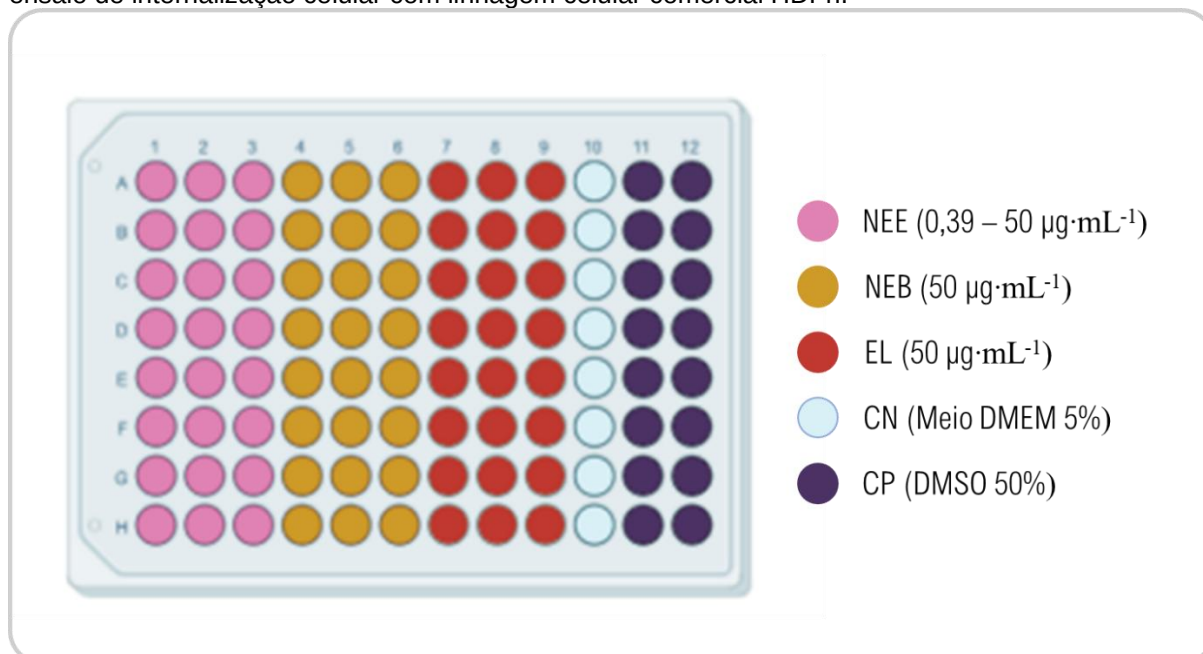
Os dados foram coletados com o software Exponent® Lite versão 6.1.9 (Stable Micro Systems, Surrey, Reino Unido) para determinar a dureza, a compressibilidade, a adesividade e a coesão do material.

4.5 Cultura celular

4.5.1 Avaliação da internalização celular (UPTAKE)

Para a avaliação da internalização celular foi utilizada a linhagem comercial de fibroblastos humanos imortalizados (HDFn). As células foram semeadas em duas microplacas de 96 poços ($1,0 \times 10^4$ células/poço) e incubadas por 24 h. Após o período de incubação, as células foram tratadas com EL ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com NEB ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e NEE nas concentrações de 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; 50,0 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em meio de cultura DMEM alta glicose enriquecido com 5% de soro fetal bovino. Além disso, foi realizado o controle positivo (CP), com 50% de DMSO em meio DMEM 5%, o controle negativo (CN) contendo apenas o meio de cultura (Figura 16).

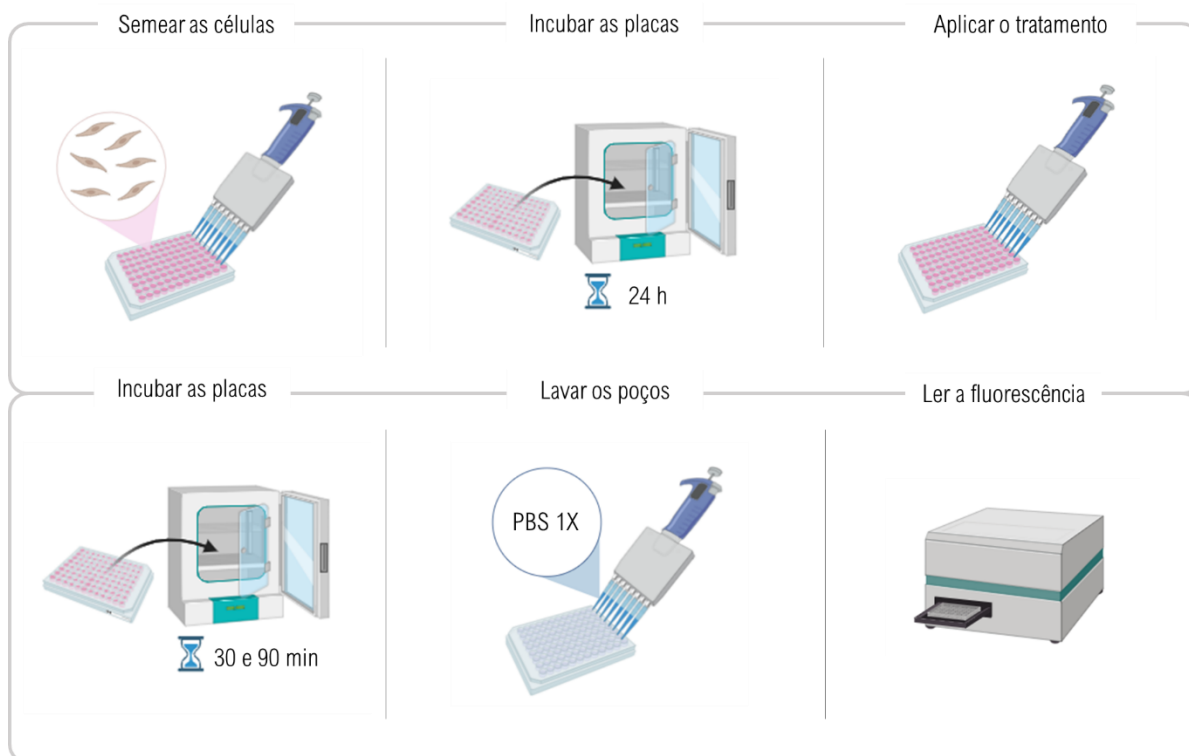
Figura 16 – Representação esquemática da estratégia experimental do ensaio de citotoxicidade e ensaio de internalização celular com linhagem celular comercial HDFn.



Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com.

Após o tratamento, os poços foram lavados 2 vezes com solução tampão PBS estéril. Em seguida, as células foram mantidas hidratadas em solução tampão PBS estéril e foi realizada a análise da fluorescência dos poços em leitor de microplacas EnSpire® (PerkinElmer, EUA) com comprimento de onda de excitação a 500 nm e emissão a 550 nm (Calori *et al.*, 2020) (Figura 17).

Figura 17 – Representação esquemática das etapas necessárias para a realização do ensaio de internalização celular.



Fonte: Própria autora, criado em BioRender. com.

4.5.2 Avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões em cultura celular 2D com a linhagem celular HDFn

Para a avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões em cultura celular 2D foi utilizada a linhagem comercial de fibroblastos humanos imortalizados (HDFn) conforme preconizado pela ISO 10993-5, com modificações, para testes de citotoxicidade. As células foram semeadas em duas microplacas de 96 poços ($1,0 \times 10^4$ células/poço) e incubadas por 24 h. Após o período de incubação, as células foram tratadas com EL ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com NEB ($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e NEE nas concentrações de 0,39; 0,78; 1,56; 3,12; 6,25; 12,5; 25,0; $50,0 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em meio de cultura DMEM enriquecido com 3% de soro fetal bovino. Além disso, foi realizado o controle positivo (CP), com 50% de DMSO em meio DMEM 5%, o controle negativo (CN) contendo apenas o meio de cultura, conforme ilustrado anteriormente na Figura 16. Após o tratamento, uma das placas foi novamente incubada por 30 min e a outra placa incubada por 90 min.

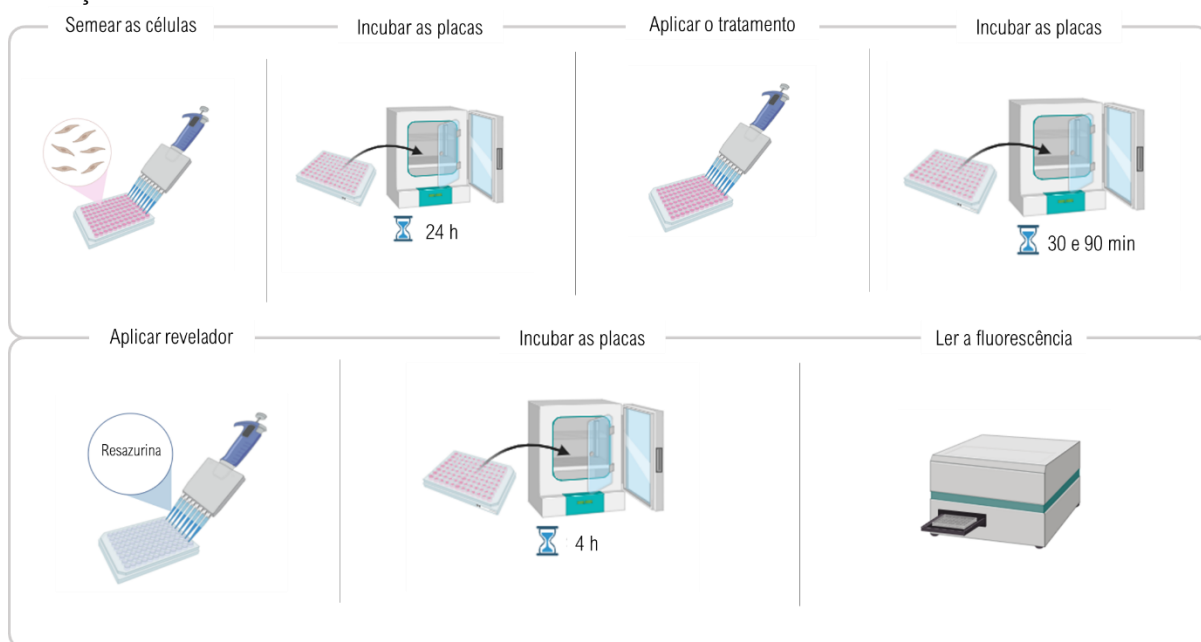
Para determinação da viabilidade celular foi empregado o teste colorimétrico da resazurina para avaliação da atividade mitocondrial conforme descrito por

(Rezende *et al.*, 2019). Após o tempo de tratamento decorrido, 100 μL de uma solução de 10% de resazurina ($25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ em meio DMEM) foi adicionada aos poços e as placas incubadas por 4 h. Em seguida, foi realizada a análise da fluorescência dos poços em leitor de microplacas EnSpire® (PerkinElmer, EUA) com comprimento de onda de excitação a 540 nm e emissão a 590 nm (Figura 18). A porcentagem de células viáveis foi calculada segundo a Equação 9.

$$\text{Viabilidade celular (\%)} = \left(\frac{\text{DO}_{\text{amostra}}}{\text{DO}_{\text{controle negativo}}} \right) \times 100 \quad (9)$$

Onde, **DO_{amostra}** corresponde ao valor da densidade óptica da amostra e **DO_{controle negativo}** corresponde ao valor da densidade óptica do controle negativo.

Figura 18 – Representação esquemática das etapas necessárias para a realização do ensaio de avaliação da atividade citotóxica.



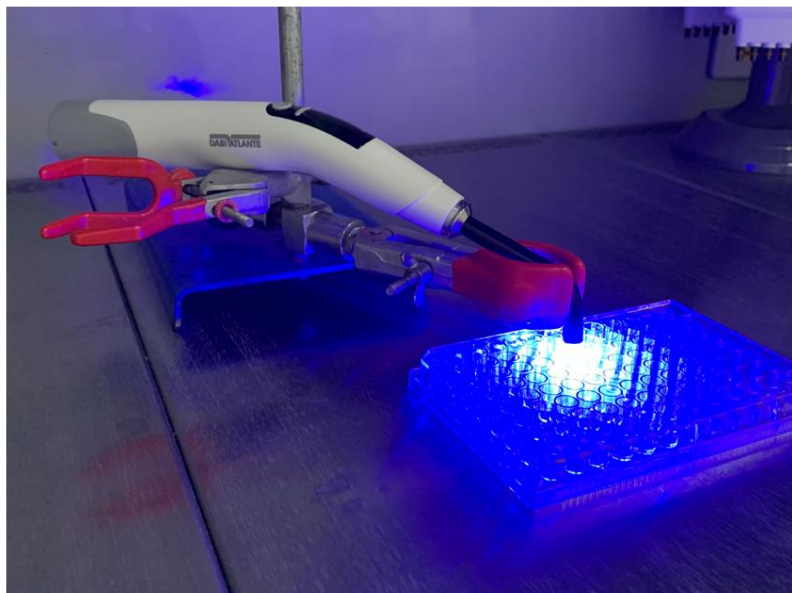
Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com.

4.5.3 Ensaios de eficácia baseado na atividade fotodinâmica das nanoemulsões *in vitro* em cultura celular 2D com a linhagem celular T98-G

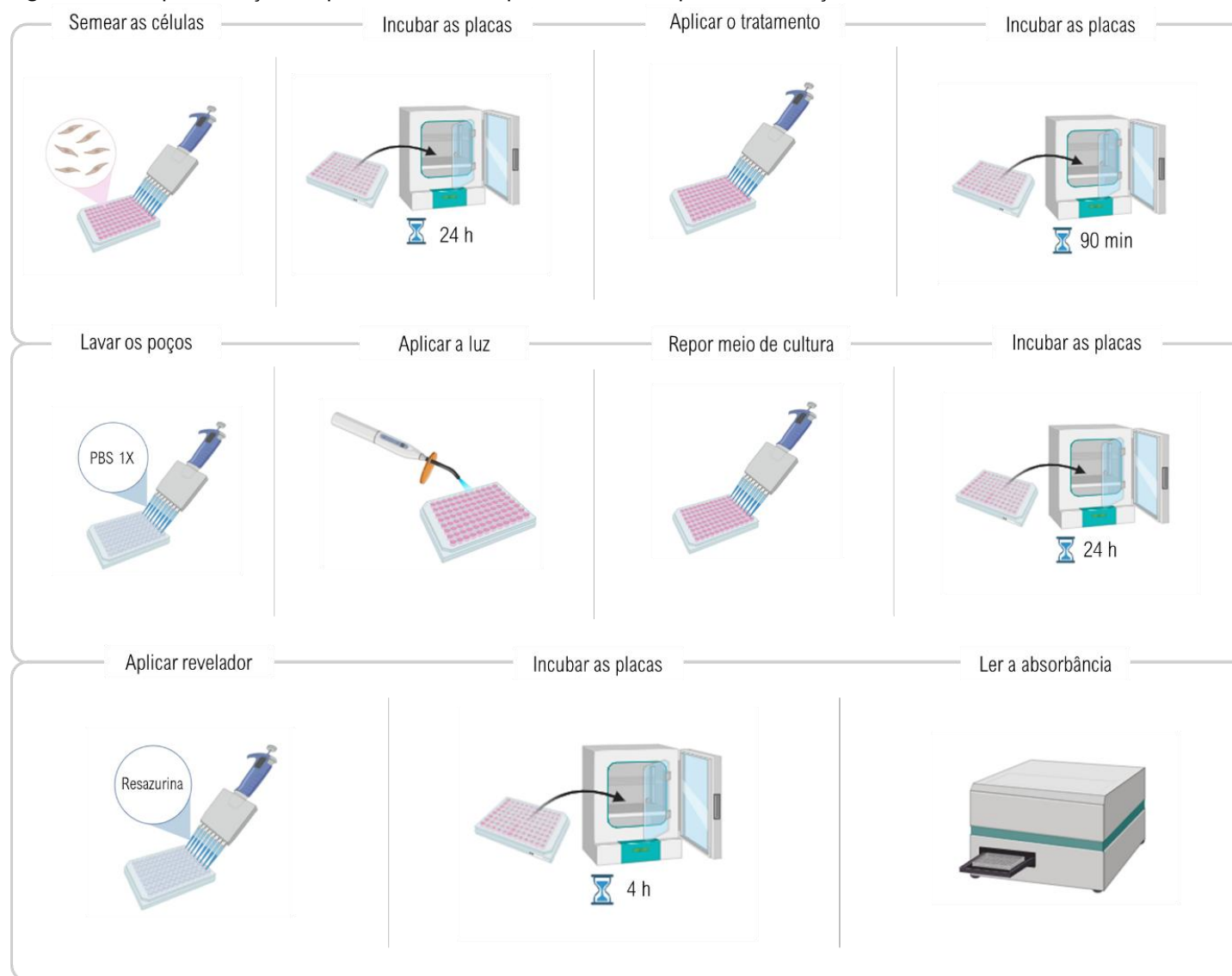
Para a avaliação da atividade fotodinâmica da NEE *in vitro* em cultura celular 2D, foi utilizada a linhagem celular de GBM T98-G. As células de GBM foram semeadas em placas de 96 poços ($1,2 \cdot 10^4$ células/poço) e incubadas por 24 h. Após a incubação, as células foram tratadas com NEE ($1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e incubadas por 90

min a 37°C numa atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂. Em seguida, os poços foram lavados com tampão PBS, para remover toda a amostra não internalizada pelas células, e irradiados utilizando LED de alta potência (Fotopolimerizador Optilight Max, Dabi Atlante, Ribeirão Preto, Brasil) a 500 nm com potência de 1200 mW (Figura 19). As fluências (densidades de energia) utilizadas foram 15, 30 e 50 J·cm⁻². Após a PDT, as células foram incubadas durante 24 h e, na sequência, tratadas utilizando o teste colorimétrico da resazurina para avaliação da atividade mitocondrial das células (Figura 20).

Figura 19 – Foto do ensaio de eficácia baseado na TFD *in vitro*. Luz LED em 500 nm de alta potência (Fotopolimerizador Optilight Max, Dabi Atlante, Brasil) sendo administrada sobre os poços contendo células tumorais da linhagem comercial T98-G em monocamada.



Fonte: Própria autora.

Figura 20 – Representação esquemática das etapas necessárias para a realização do ensaio de TFD em cultura celular.

Fonte: Própria autora, criado em BioRender.com

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Desenvolvimento e validação de metodologia analítica de quantificação da Eritrosina por espectrofotometria de absorção no UV-Vis

5.1.1 Linearidade

A validação analítica tem como objetivo assegurar que o método é adequado para o uso a que se destina (Brasil, 2017). Segundo a RDC nº 166, um método analítico quando linear é capaz de obter respostas analíticas diretamente proporcionais com a concentração da amostra analisada.

Os valores das absorbâncias obtidos para a curva analítica da Eritrosina utilizando acetonitrila estão apresentados na Tabela 1 e para o tampão fosfato estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 1 – Valores de absorbância referentes às concentrações de Eritrosina em acetonitrila utilizadas para a determinação da linearidade do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	CMD	DP	DPR (%)
22,0	1,270	1,502	1,523	1,432	22,291	0,140	0,554
17,6	0,968	1,216	1,063	1,082	17,062	0,125	0,645
13,2	0,697	0,906	0,889	0,831	13,294	0,116	0,768
8,8	0,473	0,599	0,567	0,546	9,038	0,065	0,638
6,6	0,356	0,378	0,410	0,381	6,568	0,027	0,364
4,4	0,179	0,230	0,287	0,232	4,332	0,054	1,097

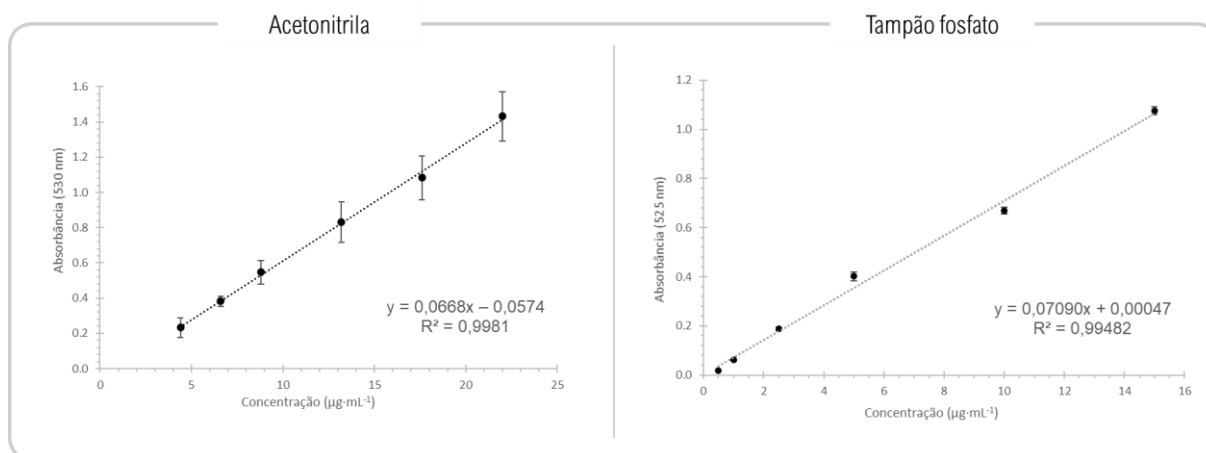
Fonte: Própria autora. CMD: Concentração média determinada; DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo

Tabela 2 – Valores de absorvância referentes às concentrações de Eritrosina em tampão fosfato utilizadas para a determinação da linearidade do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	CMD	DP	DPR (%)
15,0	1,078	1,057	1,089	1,075	15,151	0,016	0,107
10,0	0,655	0,672	0,682	0,670	9,439	0,014	0,145
5,0	0,385	0,420	0,399	0,401	5,654	0,018	0,312
2,5	0,195	0,180	0,186	0,187	2,631	0,008	0,287
1,0	0,062	0,064	0,058	0,061	0,858	0,003	0,356
0,5	0,019	0,019	0,020	0,019	0,266	0,001	0,217

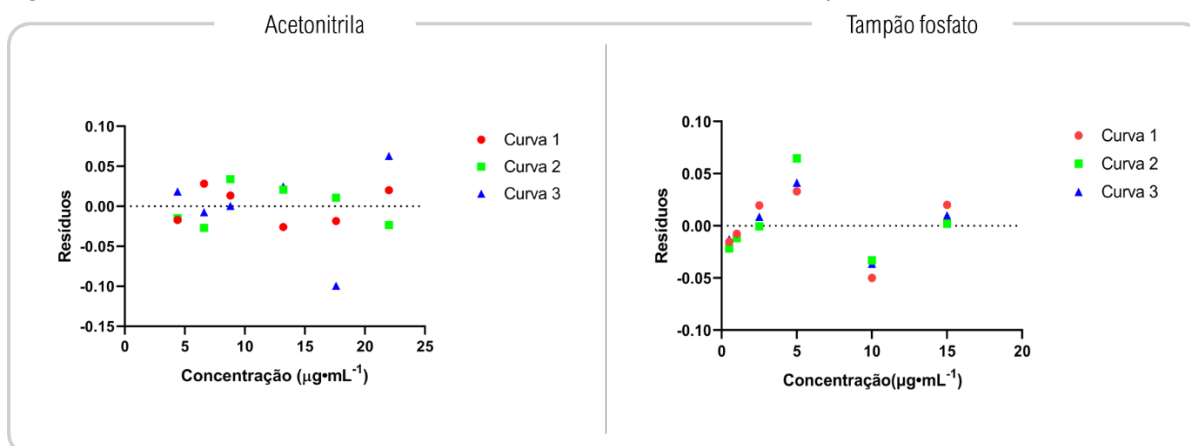
Fonte: Própria autora. CMD: Concentração média determinada; DP: Desvio padrão; DPR: Desvio padrão relativo

A curva analítica da Eritrosina em acetonitrila e tampão fosfato (Figura 21) foram construídas com os valores das concentrações versus os valores das médias de absorvância das três curvas analíticas obtidas. A equação da reta foi determinada pelo método dos mínimos quadrados e o coeficiente de correlação foi satisfatório indicando correlação linear entre os dados analisados.

Figura 21 – Curvas analíticas da Eritrosina em acetonitrila e tampão fosfato obtida pelo método espectrofotométrico de absorção no UV-visível (n = 3).

Fonte: Própria autora, criado em Microsoft Excel.

Além disso, foram avaliados os resíduos e a estatística, conforme preconizado pela RDC nº 166, de 24 de julho de 2017 (Figuras 22 e 23).

Figura 22 – Gráficos de resíduos da linearidade em acetonitrila e tampão fosfato.

Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism9.0.

Figura 23 – Tabelas com resultados da análise de variância das médias das absorbâncias em acetonitrila e tampão fosfato.

Acetonitrila						Tampão fosfato					
Análise de Variância						Análise de Variância					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P	Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Fator	2	0,07948	0,03974	0,19	0,828	Fator	2	0,00013	0,000067	0,00	1,000
Erro	15	3,11611	0,20774			Erro	15	2,50004	0,166669		
Total	17	3,19559				Total	17	2,50017			

Fonte: Própria autora, criado em Minitab 18.

Após a análise dos resultados apresentados, é possível afirmar que os métodos analíticos são lineares e não apresentam variação significativa entre as médias ($F < \text{Valor-P}$) (Brasil, 2017).

5.1.2 Precisão

A precisão tem como objetivo avaliar a proximidade entre os resultados obtidos (Brasil, 2017). A precisão foi avaliada por meio da repetibilidade e da precisão intermediária.

Os dados obtidos para a repetibilidade em acetonitrila e tampão fosfato estão descritos na Tabela 3 e 4, respectivamente.

Tabela 3 – Valores de absorvância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila no estudo de repetibilidade do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Repetibilidade				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR (%)
22,0	1,039	1,252	1,227	1,173	0,556
11,0	0,522	0,545	0,598	0,555	0,374
4,4	0,211	0,198	0,165	0,191	0,560

Fonte: Própria autora. DPR: desvio padrão relativo

Tabela 4 – Valores de absorvância em 525 nm da Eritrosina em tampão fosfato no estudo de repetibilidade do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Repetibilidade				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR (%)
15,0	1,240	1,207	1,297	1,248	0,259
2,5	0,206	0,203	0,210	0,206	0,121
0,5	0,042	0,044	0,040	0,042	0,341

Fonte: Própria autora. DPR: desvio padrão relativo

Os dados obtidos para a precisão intermediária estão descritos na Tabela 5 e 6, seguido da análise estatística (Figura 24).

Tabela 5 – Valores de absorvância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila no estudo de precisão intermediária do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Analista 1				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR (%)
22,0	1,351	1,368	1,250	1,323	0,272
11,0	0,609	0,670	0,717	0,665	0,440
4,4	0,207	0,250	0,248	0,235	0,488

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Analista 2				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR (%)
22,0	1,208	1,345	1,336	1,296	0,333
11,0	0,743	0,742	0,575	0,687	0,764
4,4	0,229	0,186	0,135	0,183	1,149

Fonte: Própria autora. DPR: desvio padrão relativo

Tabela 6 – Valores de absorvância em 525 nm da Eritrosina em tampão fosfato no estudo de precisão intermediária do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Analista 1				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR (%)
15,0	1,303	1,309	1,252	1,288	0,172
2,5	0,241	0,229	0,200	0,223	0,672
0,5	0,060	0,054	0,055	0,056	0,410

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Analista 2				
	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DPR (%)
15,0	0,977	0,987	1,185	1,050	0,793
2,5	0,206	0,208	0,201	0,205	0,125
0,5	0,045	0,046	0,044	0,045	0,159

Fonte: Própria autora. DPR: desvio padrão relativo

Figura 24 – Tabelas com resultados da análise de variância das médias das absorvâncias entre os analistas no estudo de precisão intermediária do método analítico.

Acetonitrila						Tampão fosfato					
Análise de Variância						Análise de Variância					
Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P	Fonte	GL	SQ (Aj.)	QM (Aj.)	Valor F	Valor-P
Fator	1	0,00054	0,000542	0,00	0,968	Fator	1	0,01188	0,01188	0,03	0,866
Erro	4	1,22175	0,305439			Erro	4	1,47653	0,36913		
Total	5	1,22230				Total	5	1,48841			

Fonte: Própria autora, criado em Minitab 18.

Após a análise dos resultados obtidos, é possível afirmar que os métodos analíticos são precisos pois, não apresentaram desvio padrão relativo superior a 5%, além de não haver diferença significativa entre as médias das absorvâncias dos dois analistas ($F < \text{Valor-P}$).

5.1.3 Exatidão

A exatidão é definida como o grau de concordância entre os resultados obtidos com a amostra e os valores teóricos (Brasil, 2017). A Tabela 7 e 8 descrevem os

valores encontrados para a exatidão do método analítico para acetonitrila e para solução tampão fosfato, respectivamente.

Tabela 7 – Valores de absorbância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila para a determinação da exatidão do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP	CMD	DPR (%)	Exatidão
22,0	1,317	1,303	1,389	1,336	0,046	20,864	0,221	94,84
11,0	0,660	0,650	0,506	0,605	0,086	9,921	0,869	90,19
4,4	0,234	0,238	0,222	0,231	0,008	4,322	0,193	98,24

Fonte: Própria autora. DP: desvio padrão; CMD: concentração média determinada; DPR: desvio padrão relativo

Tabela 8 – Valores de absorbância em 525 nm da Eritrosina em solução tampão fosfato para a determinação da exatidão do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP	CMD	DPR (%)	Exatidão
15,0	1,191	1,165	1,117	1,158	0,038	16,322	0,230	108,81
2,5	0,183	0,200	0,179	0,187	0,011	2,636	0,423	105,42
0,5	0,034	0,038	0,034	0,035	0,002	0,492	0,470	98,35

Fonte: Própria autora. DP: desvio padrão; CMD: concentração média determinada; DPR: desvio padrão relativo

Após a análise dos resultados é possível determinar que os métodos analíticos são exatos, pois apresentam variação inferior a 20%, conforme preconizado pela legislação (Brasil, 2017).

5.1.4 Limites de detecção e quantificação

O limite de detecção é definido como a menor concentração que o método analítico é capaz de detectar, e o limite de quantificação é definido como a menor concentração que o método analítico é capaz de quantificar (Brasil, 2017).

Aplicando os valores descritos nas Tabelas 9, para acetonitrila, e Tabela 10, para solução tampão fosfato, nas Equações 3 e 4, foi possível determinar os limites de detecção e quantificação. Para a validação em acetonitrila, os valores do LD e LQ foram calculados como 0,988 e 2,994 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Para a validação em solução tampão fosfato, os valores de LD e LQ foram calculados como 0,2121 e 0,6428 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente.

Fernanda Borges de Almeida

Tabela 9 – Dados da linearidade utilizados para a determinação dos limites de detecção e quantificação da Eritrosina em acetonitrila.

	Intercepção com o eixo Y	Inclinação da curva analítica
Curva 1	-0.06739	0.05269
Curva 2	-0.07524	0.06403
Curva 3	-0.02944	0.05958
Média	-0.05735	0.05877
Desvio Padrão	0.01999	0.001294

Fonte: Própria autora.

Tabela 10 – Dados da linearidade utilizados para a determinação dos limites de detecção e quantificação da Eritrosina em solução tampão fosfato.

	Intercepção com o eixo Y	Inclinação da curva analítica
Curva 1	-0.001093	0.07060
Curva 2	0.005603	0.06995
Curva 3	-0.003101	0.07214
Média	0.000470	0.07090
Desvio Padrão	0.004558	0.001125

Fonte: Própria autora.

5.1.5 Robustez

A robustez é a capacidade que o método analítico tem de resistir a pequenas e deliberadas variações das condições analíticas (Brasil, 2017). Para métodos espectrofotométricos devem ser alteradas a marca do fabricante de solvente utilizado no preparo das amostras e o volume da cubeta de quartzo utilizada para as leituras, quanto a marca do fabricante do solvente utilizado não for possível, pode-se substituir o equipamento utilizado.

Os valores obtidos para a robustez estão descritos na Tabela 11 e 12.

Tabela 11 – Valores de absorbância em 530 nm da Eritrosina em acetonitrila para a determinação da robustez do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP	CMD	DPR (%)
22,0	1,282	1,236	1,195	1,238	0,044	19,387	0,224
11,0	0,624	0,621	0,584	0,610	0,022	9,986	0,223
4,4	0,205	0,231	0,169	0,202	0,031	3,878	0,803

Fonte: Própria autora. DP: desvio padrão; CMD: concentração média determinada; DPR: desvio padrão relativo

Fernanda Borges de Almeida

Tabela 12 – Valores de absorbância em 525 nm da Eritrosina em solução tampão fosfato para a determinação da robustez do método analítico.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Curva 1	Curva 2	Curva 3	Média	DP	CMD	DPR (%)
15,0	1,174	1,176	1,219	1,190	0,025	16,773	0,152
2,5	0,238	0,199	0,214	0,217	0,020	3,054	0,644
0,5	0,046	0,047	0,046	0,046	0,001	0,647	0,089

Fonte: Própria autora. DP: desvio padrão; CMD: concentração média determinada; DPR: desvio padrão relativo

Após a análise dos resultados os métodos podem ser considerados robustos, visto que após as alterações no método analítico, o desvio padrão relativo não demonstrou variação superior a 5%.

5.2 Desenvolvimento dos sistemas nanoemulsionados

5.2.1 Avaliação da solubilidade da Eritrosina em diferentes matérias-primas

Para a escolha da matéria-prima que seria usada na síntese da nanoemulsão, foi avaliada a solubilidade da Eritrosina em miristato de isopropila, óleo de soja e Crodamol™ GTCC. A solubilidade foi avaliada segundo a metodologia descrita na 6ª edição da Farmacopeia Brasileira volume 1 (Brasil, 2019a) e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – Avaliação da solubilidade da Eritrosina em diferentes matérias-primas.

Matérias-primas	Solubilidade
Miristato de Isopropila	Muito solúvel
Crodamol™ GTCC	Facilmente solúvel
Óleo de soja	Solúvel

Fonte: Própria autora.

O miristato de isopropila é uma mistura de ésteres do álcool isopropílico com ácidos graxos saturados. Apresenta baixa tendência à hidrólise e a oxidação sendo amplamente utilizado na indústria farmacêutica como agente solubilizante de corantes e substâncias lipossolúveis (Química, 2022).

O Crodamol™ GTCC trata-se de um triglicerídeo do ácido cáprico e caprílico derivado do óleo de coco e é recomendado como uma opção em substituição aos óleos minerais em formulações farmacêuticas. Além disso, os ésteres derivados do ácido cáprico e caprílico são estáveis frente a oxidação e amplamente utilizados em preparações farmacêuticas de uso intravenoso (Mapric, [s.d.]).

O óleo de soja consiste em uma mistura de diversos ácidos graxos sendo os ácidos linoleico e oleico os componentes majoritários e é comumente utilizado na indústria alimentícia e na indústria cosmética como agente emoliente e hidratante (SpecialChem, [s.d.]).

A solubilidade da Eritrosina é um parâmetro fundamental na etapa do desenvolvimento do sistema nanoemulsionado, pois o fármaco precisa estar totalmente solúvel na fase orgânica para que possa ser realizada a formação da gotícula e a consequente encapsulação da Eritrosina (Jafari e McClements, 2018). Dessa maneira, o miristato de isopropila foi escolhido como a melhor matéria-prima para a síntese da nanoemulsão.

5.2.2 Avaliação da influência de diferentes tensoativos sobre a nanoemulsificação

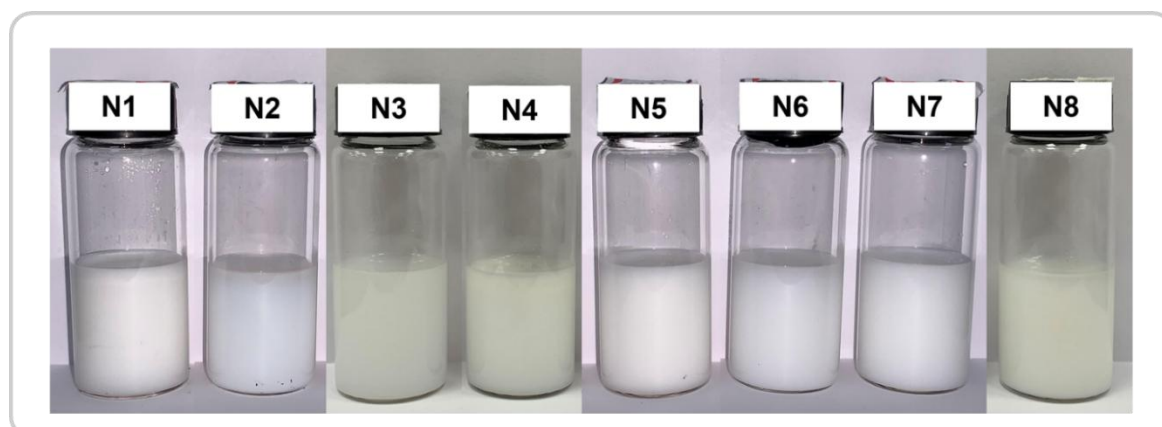
Após a escolha da melhor matéria-prima para a solubilização da Eritrosina, foi avaliada a influência de diferentes tensoativos não iônicos sobre o processo de nanoemulsificação. Foram avaliados os tensoativos, polissorbato 20 (T20), polissorbato 80 (T80), monolaurato de sorbitano (S20), oleth-3 (BO3), monooleato de sorbitano (S80) e trioleato de sorbitano (S85), em diferentes proporções, de forma que obtivessem o equilíbrio hidrófilo-lipófilo requerido (EHL_r) de 11,5, que é o valor de EHL do miristato de isopropila (Tabela 14).

Tabela 14 – Proporção de tensoativos utilizados no desenvolvimento da nanoemulsão.

Amostra	Matéria-prima	Tensoativo A	Tensoativo B	Percentual	Percentual
				Tensoativo A	Tensoativo B
N1		T20 (EHL 16,7)	S20 (EHL 9,0)	32,47	67,53
N2		T20 (EHL 16,7)	S80 (EHL 4,3)	58,06	41,94
N3		T20 (EHL 16,7)	BO3 (EHL 6,6)	48,51	51,49
N4	Miristato de Isopropila (EHL 11,5)	T20 (EHL 16,7)	S85 (EHL 1,8)	65,10	34,90
N5		T80 (EHL 15)	S20 (EHL 9,0)	41,67	58,33
N6		T80 (EHL 15)	S80 (EHL 4,3)	67,29	32,71
N7		T80 (EHL 15)	BO3 (EHL 6,6)	58,33	41,67
N8		T80 (EHL 15)	S85 (EHL 1,8)	73,48	26,52

Fonte: Própria autora.

Após a síntese, as formulações obtidas foram deixadas 24 h em repouso para avaliação macroscópica dos parâmetros de instabilidade (Figura 25).

Figura 25 – Formulações sintetizadas para escolha do melhor par de tensoativos.

Fonte: Própria autora.

Após o tempo de repouso, apenas as formulações N2, N3 e N8 não apresentaram a formação de cremagem, sendo avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas, índice de polidispersão e potencial Zeta (Tabela 15).

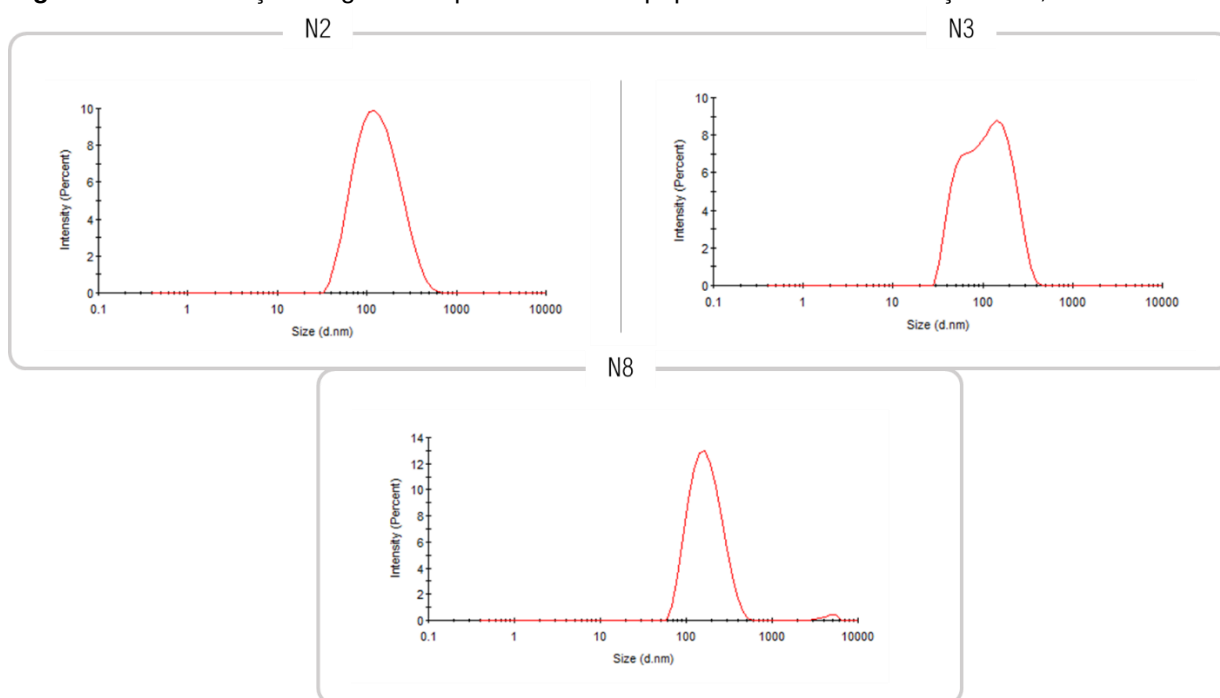
Tabela 15 – Caracterização das formulações que não apresentaram instabilidade quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta.

Amostra	DHM (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
N2	107,7 ± 2,438	0,23 ± 0,021	-16,8 ± 0,208
N3	91,3 ± 0,745	0,24 ± 0,014	-11,7 ± 0,153
N8	149,8 ± 0,321	0,20 ± 0,008	-18,4 ± 0,265

Fonte: Própria autora. DHM: diâmetro hidrodinâmico médio; Pdl: índice de polidispersão

Além disso, também foram avaliados os gráficos de distribuição do tamanho de gotícula por intensidade populacional (Figura 26).

Figura 26 – Distribuição de gotículas por intensidade populacional das formulações N2, N3 e N8.



Uma estratégia amplamente utilizada para a obtenção de nanoemulsões estáveis é o uso da escala semiempírica de EHL desenvolvida por (Griffin, 1949). Entretanto, essa escala apresenta diversas limitações, dentre elas pode ser citada a

ausência da avaliação do impacto que as diferentes estruturas químicas, dos tensoativos existentes, geram no tamanho e na estabilidade das gotículas, devido as interações químicas entre o lipídio e os tensoativos utilizados (Almeida *et al.*, 2022; Fernandes *et al.*, 2014; Izquierdo *et al.*, 2002, 2005; Komaiko e McClements, 2015a; Kunieda e Miyajima, 1989; Orafidiya e Oladimeji, 2002; Solans *et al.*, 2005; Solans e Solé, 2012; Solé *et al.*, 2006; Tadros *et al.*, 2004). Dessa maneira, se faz necessário a avaliação de diferentes tensoativos sobre o processo de formação das nanoemulsões.

Após a análise macroscópica das formulações e dos resultados obtidos através das técnicas de espalhamento dinâmico da luz e mobilidade eletroforética, a formulação N2 foi a que apresentou o melhor desempenho. Sendo assim, os tensoativos polissorbato 20 (T20) e monooleato de sorbitano (S80) foram escolhidos como os mais adequados. Visto que a nanoemulsão obtida não apresentou formação de cremagem, DHM de 107,7 nm e Pdl de 0,235, estando em consonância com os dados da literatura para sistemas nanoemulsionados (Ahmed *et al.*, 2012; Jafari e McClements, 2018; Musazzi *et al.*, 2018; Solans e Solé, 2012; Sousa *et al.*, 2022).

5.2.3 Determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário

Após a avaliação da mobilidade eletroforética da formulação N2, foi observado que o valor de potencial Zeta, 16,8 mV em módulo, estava fora dos índices de maior tendência à estabilidade da dispersão, acima de 30 mV em módulo (Bhattacharjee, 2016; Jafari e McClements, 2018).

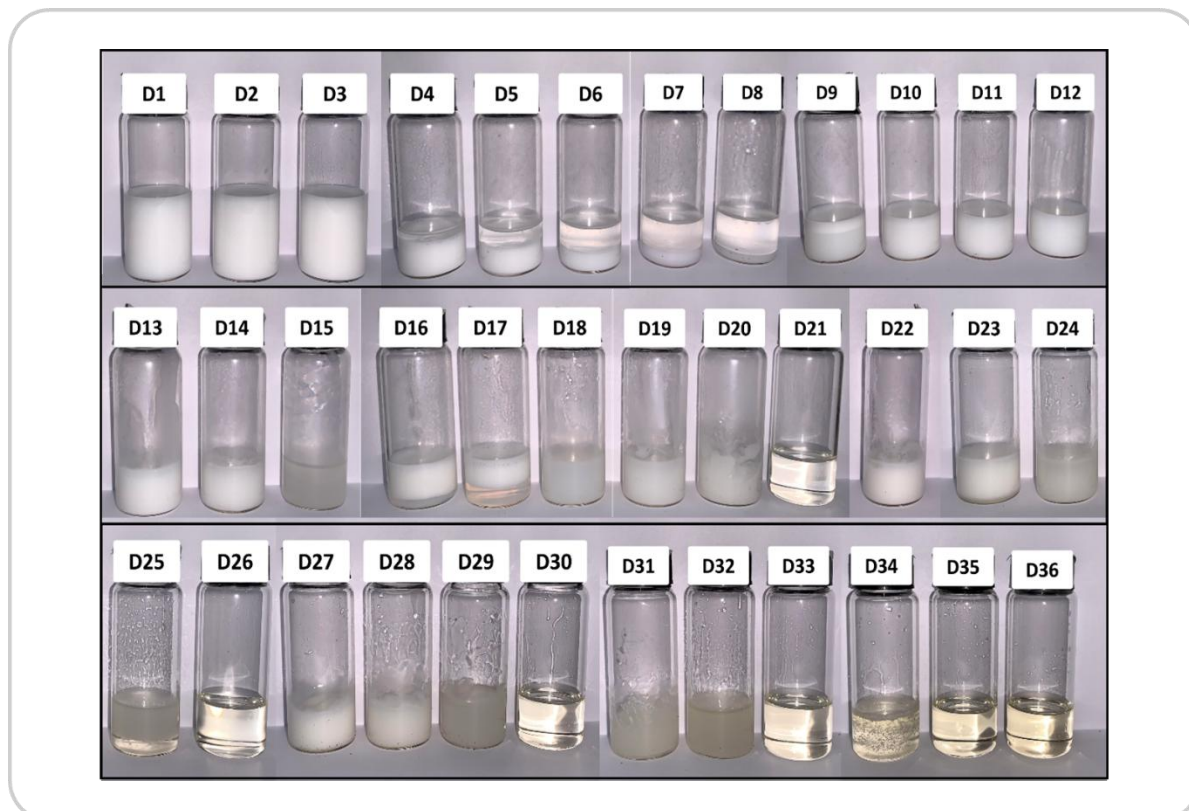
Nesse contexto, foi realizada a determinação da região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário, a fim de se obter formulações com melhor valor de potencial Zeta e, consequentemente, maior grau de estabilidade.

Sendo assim, inicialmente foram preparadas 36 formulações correspondentes aos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário. A composição percentual de cada formulação está descrita na Tabela 16 e as formulações obtidas estão ilustradas na Figura 27. Após a síntese, as formulações foram deixadas 24 h em repouso para análise macroscópica dos parâmetros de instabilidade.

Tabela 16 – Composição percentual das formulações obtidas a partir dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário.

Ponto	Tensoativos	Óleo	H ₂ O	Ponto	Tensoativos	Óleo	H ₂ O
D1	10	10	80	D19	30	40	30
D2	10	20	70	D20	30	50	20
D3	10	30	60	D21	30	60	10
D4	10	40	50	D22	40	10	50
D5	10	50	40	D23	40	20	40
D6	10	60	30	D24	40	30	30
D7	10	70	20	D25	40	40	20
D8	10	80	10	D26	40	50	10
D9	20	10	70	D27	50	10	40
D10	20	20	60	D28	50	20	30
D11	20	30	50	D29	50	30	20
D12	20	40	40	D30	50	40	10
D13	20	50	30	D31	60	10	30
D14	20	60	20	D32	60	20	20
D15	20	70	10	D33	60	30	10
D16	30	10	60	D34	70	10	20
D17	30	20	50	D35	70	20	10
D18	30	30	40	D36	80	10	10

Fonte: Própria autora.

Figura 27 – Formulações obtidas a partir dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário.

Fonte: Própria autora.

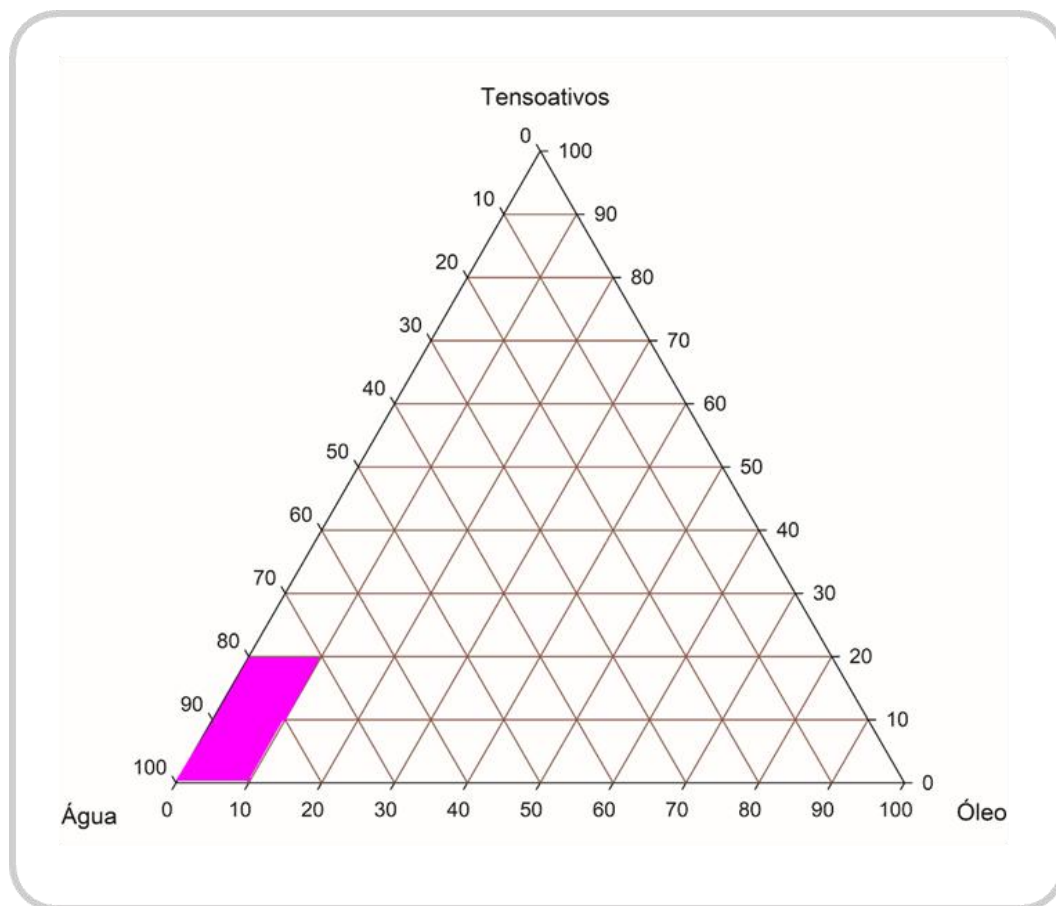
Após a análise macroscópica dos parâmetros de instabilidade, apenas as formulações D1, D2 e D3 não apresentaram a formação de cremagem, sendo, portanto, caracterizadas quanto ao DHM, Pdl e potencial Zeta (Tabela 17).

Tabela 17 – Caracterização das formulações obtidas a partir dos pontos principais do diagrama de fases pseudoternário, que não apresentaram instabilidade, quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta.

Amostra	DHM (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
D1	151,5 ± 2,060	0,25 ± 0,011	-26,5 ± 0,551
D2	187,0 ± 1,531	0,18 ± 0,017	- 29,4 ± 0,252
D3	245,7 ± 8,815	0,23 ± 0,021	-23,9 ± 0,451

Fonte: Própria autora.

Apenas as formulações D1 e D2 apresentaram DHM correspondente à nanoemulsões. Sendo assim, a região de formação de nanoemulsões do diagrama de fases pseudoternário, contendo miristato de isopropila como óleo, polissorbato 20 e monooleato de sorbitano como tensoativos, foi determinada conforme destacado na Figura 28.

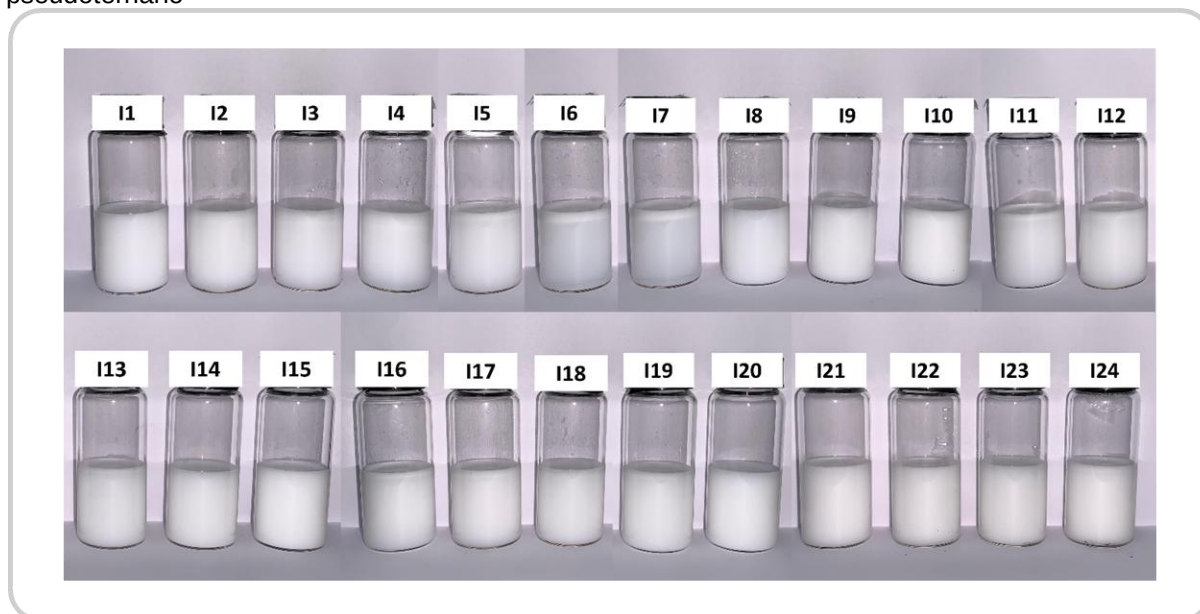
Figura 28 – Região de formação de nanoemulsões do diagrama de fases pseudoternário.

Fonte: Própria autora, criado em SigmaPlot 11.0.

A fim de se obter nanoemulsões estáveis com maior percentual de água, foram sintetizadas 24 novas formulações dentro da região de formação de nanoemulsões. A composição percentual das formulações está descrita na Tabela 18 e as formulações obtidas estão ilustradas na Figura 29.

Tabela 18 – Composição percentual das formulações obtidas a partir dos pontos intermediários do diagrama de fases pseudoternário.

Ponto	Tensoativos	Óleo	H ₂ O	Ponto	Tensoativos	Óleo	H ₂ O
I1	2	2	96	I13	6	6	88
I2	2	4	94	I14	6	8	86
I3	2	6	92	I15	6	10	84
I4	2	8	90	I16	8	2	90
I5	2	10	88	I17	8	4	88
I6	4	2	94	I18	8	6	86
I7	4	4	92	I19	8	8	84
I8	4	6	90	I20	8	10	82
I9	4	8	88	I21	10	2	88
I10	4	10	86	I22	10	4	86
I11	6	2	92	I23	10	6	84
I12	6	4	90	I24	10	8	82

Fonte: Própria autora.**Figura 29** – Formulações obtidas a partir dos pontos intermediários do diagrama de fases pseudoternário**Fonte:** Própria autora.

Após a análise macroscópica dos parâmetros de instabilidade, apenas as formulações I1, I2, I8, I9, I14 e I15 não apresentaram a formação de cremagem, sendo, portanto, caracterizadas quanto ao DHM, Pdl e potencial Zeta (Tabela 19).

Tabela 19 – Caracterização das formulações obtidas a partir dos pontos intermediários do diagrama de fases pseudoternário, que não apresentaram instabilidade, quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta.

Amostra	DHM (nm)	PdI	Potencial Zeta (mV)
I1	122,1 ± 2,538	0,17 ± 0,015	-31,9 ± 1,020
I2	156,8 ± 0,971	0,12 ± 0,021	-35,2 ± 0,900
I8	135,4 ± 1,242	0,12 ± 0,006	-29,8 ± 1,880
I9	187,8 ± 6,558	0,25 ± 0,004	-34,2 ± 0,560
I14	153,3 ± 3,051	0,16 ± 0,018	-27,2 ± 0,100
I15	165,6 ± 2,411	0,18 ± 0,012	-35,2 ± 1,120

Fonte: Própria autora.

As demais formulações apresentaram a formação de cremagem e, portanto, não foram avaliadas por espalhamento dinâmico da luz e mobilidade eletroforética.

Os parâmetros utilizados para elegibilidade das melhores formulações foram: DHM menor que 200 nm, PdI menor que 0,2 e potencial Zeta maior que 30,0 mV, em módulo (Jafari e McClements, 2018; Solans *et al.*, 2005).

Dessa maneira, apenas as formulações I1, I2 e I15 estavam dentro dos parâmetros. Embora estivesse dentro das condições estabelecidas, a formulação I15 apresentava um percentual de água abaixo de 90%, sendo, portanto, excluída das análises.

5.2.4 Incorporação da Eritrosina nas nanoemulsões

As nanoemulsões I1 e I2 foram então avaliadas quanto a incorporação da Eritrosina ao sistema. Foram incorporadas três diferentes concentrações de Eritrosina (0,1; 0,05; 0,01 mg·mL⁻¹) (Figura 30) e as formulações armazenadas em repouso por 24 h. Em seguida, as formulações foram avaliadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta (Tabela 20).

Figura 30 – Formulações I1 e I2 incorporadas com Eritrosina. **A:** 0,1 mg·mL⁻¹; **B:** 0,05 mg·mL⁻¹; **C:** 0,01 mg·mL⁻¹.



Fonte: Própria autora.

Tabela 20 – Caracterização das formulações incorporadas com Eritrosina quanto ao diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta.

Amostra	DHM (nm)	Pdl	Potencial Zeta (mV)
I1A	127,4 ± 1,877	0,16 ± 0,017	-34,6 ± 0,252
I1B	1201 ± 183,4	0,92 ± 0,048	-43,1 ± 0,764
I1C	124,0 ± 1,114	0,19 ± 0,020	-34,7 ± 1,630
I2A	167,6 ± 4,257	0,18 ± 0,026	-39,1 ± 2,170
I2B	220,0 ± 4,347	0,33 ± 0,025	-37,0 ± 0,987
I2C	191,2 ± 6,357	0,24 ± 0,008	-37,9 ± 0,755

Fonte: Própria autora.

A formulação I1A foi a única que não apresentou a formação de cremagem, além de ter apresentado menor diâmetro hidrodinâmico médio e menor valor de índice de polidispersão sendo, portanto, escolhida como a melhor formulação. Sendo assim, a composição percentual da nanoemulsão (NEE) está descrita na Tabela 21.

Tabela 21 – Composição percentual da nanoemulsão contendo Eritrosina (NEE).

Amostra	Óleo (%)	Mistura de tensoativos (%)	Água (%)	Eritrosina (%)
NEE	2	2	95,99	0,01

Fonte: Própria autora.

5.2.5 Determinação da eficiência de associação da Eritrosina nas nanoemulsões

Para a determinação da eficiência de associação da Eritrosina nas nanoemulsões, foi feita a digestão das gotículas do sistema nanoemulsionado, permitindo que a Eritrosina retornasse para a fase orgânica (acetonitrila) e fosse doseada em espectrofotômetro. Os resultados obtidos estão expressos na Tabela 22.

Tabela 22 – Resultados do ensaio de determinação da eficiência de associação da Eritrosina nas nanoemulsões.

Amostra	Concentração	Concentração	Teor (%)
	Teórica (g·L ⁻¹)	Experimental (g·L ⁻¹)	
NEEA	0,100	0,105	110,2
NEEE	0,100	0,101	106,5
NEEG	0,100	0,106	111,2

Fonte: Própria autora.

Os resultados obtidos demonstram uma alta eficiência de associação da Eritrosina no sistema nanoemulsionado.

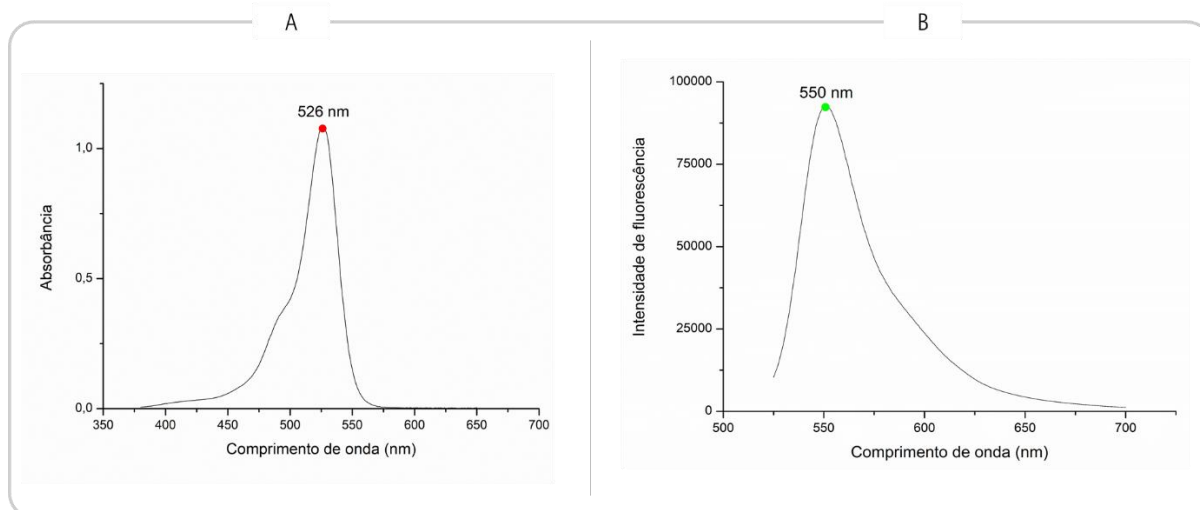
5.3 Caracterização fotofísica

5.3.1 Determinação do perfil de absorção e de emissão de fluorescência UV/Vis por espectrofotometria da Eritrosina livre e em nanoemulsão

Para a obtenção do espectro de absorção, a Eritrosina foi solubilizada em água ultrapura em uma concentração de 10 µM e, em seguida, foi realizada a varredura em espectrofotômetro UV-Vis na faixa de 380-650 nm (Figura 31A). O comprimento máximo de absorção da Eritrosina, em ambiente aquoso, foi determinado como 526 nm, o que está de acordo com os demais trabalhos da literatura (Costa *et al.*, 2011; Snigur *et al.*, 2022; Wood *et al.*, 2006).

Para a obtenção do espectro de emissão, foi utilizada a mesma amostra de Eritrosina analisada na varredura. Foi utilizada uma faixa de emissão de 525-700 nm com abertura das fendas de 10 nm. O comprimento máximo de emissão foi determinado como 550 nm, a partir de uma excitação fixada em 500 nm (Figura 31B).

Figura 31 – Espectro de absorção no UV-Vis da Eritrosina em água (A) ; Espectro de emissão da fluorescência no UV-Vis da Eritrosina em água (B).



Fonte: Própria autora, criado em OriginPro 8.5.

A caracterização dos perfis de absorção e emissão no UV-Vis da Eritrosina livre em água tem como objetivo determinar as características espectroscópicas dessa molécula no seu estado estacionário, a fim de se ter um padrão para comparação após o processo de sua nanoencapsulação. Visto que é esperada a manutenção do perfil espectral do fotossensibilizador, mesmo após a sua incorporação no sistema nanoemulsionado e, assim, a potencial aplicação na terapia fotodinâmica (Amaral, *et al.*, 2022). O valor máximo de absorção e de emissão da Eritrosina pode variar de acordo com o ambiente químico em que ela se encontra solubilizada (Lakowicz, 2010).

A fluorescência é definida como um tipo de luminescência e consiste na emissão de luz a partir de moléculas em estado eletronicamente excitadas. No estado excitado singleto o elétron está emparelhado no orbital molecular de mais alta energia, ao retornar ao estado fundamental a energia acumulada é liberada na forma de emissão de um fóton.

A fluorescência ocorre tipicamente em moléculas aromáticas devido à presença de orbitais moleculares π desocupados (Lakowicz, 2010). Além disso, os orbitais moleculares ocupados de maior energia (HOMO) estão próximos, em níveis energéticos, dos orbitais moleculares não ocupados de menor energia (LUMO), sendo, portanto, necessária menor energia para excitar um elétron de HOMO para LUMO (Atkins e Jones, 2006).

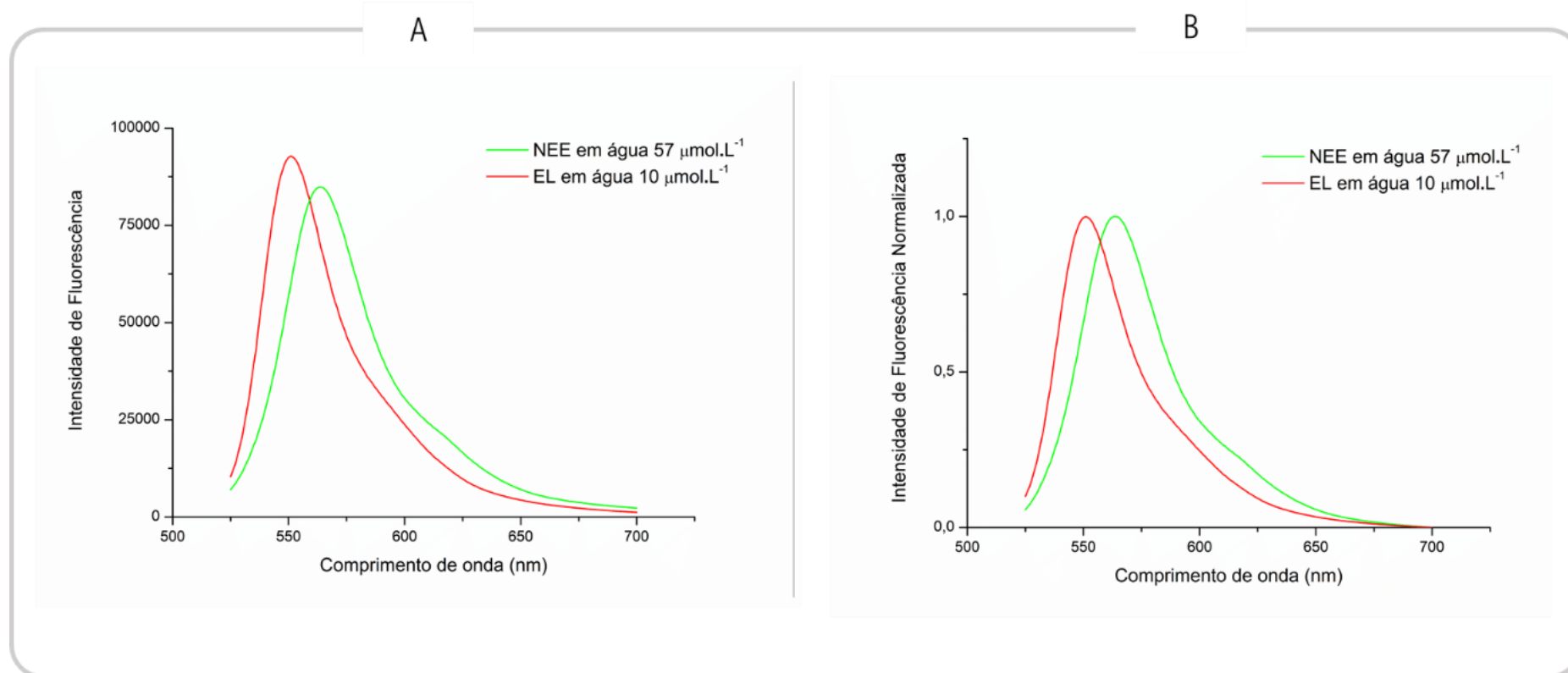
A emissão da fluorescência ocorre à medida que o elétron excitado retorna ao estado de menor nível energético, esse retorno ao nível fundamental é registrado no espectro de emissão de uma molécula. O espectro de emissão, em geral, corresponde

Fernanda Borges de Almeida

a uma imagem em espelho do espectro de absorção que ocorre na transição eletrônica do estado fundamental para o estado singleto. Essa semelhança ocorre porque a excitação eletrônica não é forte o suficiente para alterar a geometria das moléculas e consequentemente as estruturas vibracionais dos espectros de emissão e absorção são similares (Lakowicz, 2010; So e Dong, 2001).

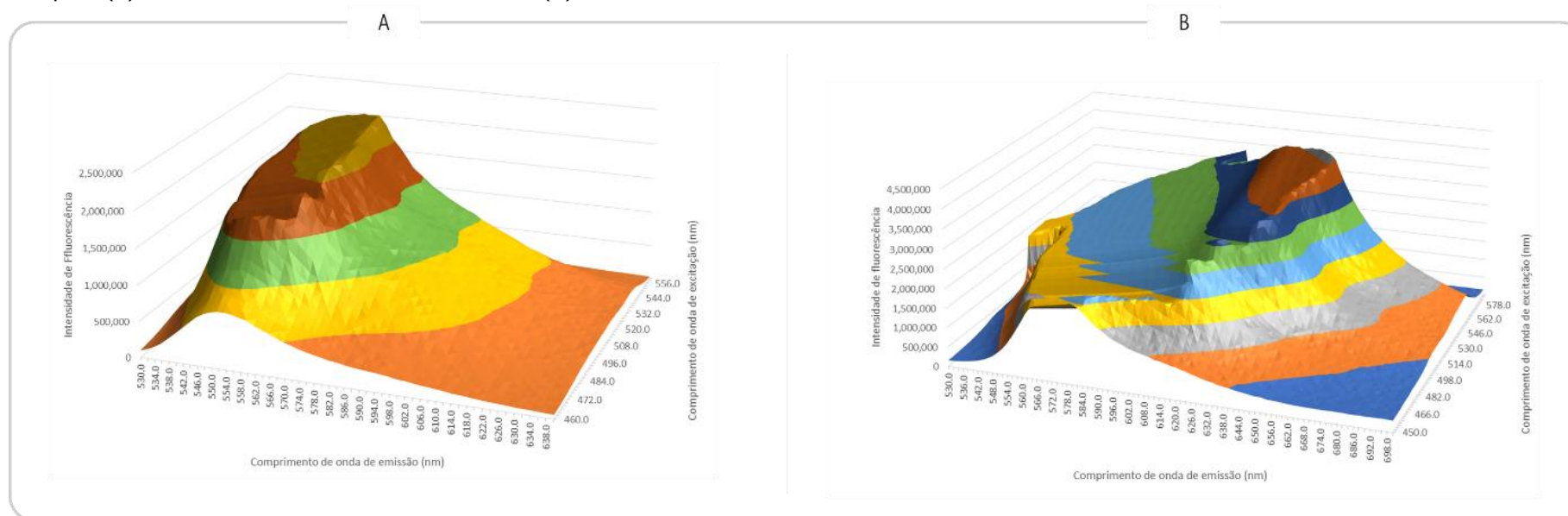
Após a escolha da melhor nanoemulsão, foi determinado o perfil de emissão da fluorescência 2D e 3D da Eritrosina nanoemulsionada. A nanoemulsão foi diluída em água até que a Eritrosina presente no sistema estivesse na concentração de 0,05 mg·mL⁻¹. A Eritrosina livre foi solubilizada em água ultrapura a uma concentração de 10 µmol·L⁻¹. Os gráficos da emissão da fluorescência 2D estão ilustrados na Figura 32 e o 3D na Figura 33.

Figura 32 – Espectros bidimensionais (2D) da intensidade de fluorescência da nanoemulsão contendo Eritrosina (NEE) e da Eritrosina livre (EL) em água ultrapura. **A**: Espectro não normalizado; **B**: Espectro normalizado.



Fonte: Própria autora, criado em OriginPro 8.5.

Figura 33 – Espectros tridimensionais (3D) da intensidade de emissão de fluorescência em função da excitação para as amostras de Eritrosina livre em água ultrapura (A) e da nanoemulsão contendo Eritrosina (B).



Fonte: Própria autora, criado em Excel.

A determinação do perfil de emissão 2D e 3D da fluorescência da Eritrosina quando nanoemulsionada é de extrema relevância, visto que pode ser utilizada como um parâmetro de controle de qualidade da formulação, podendo ser avaliada ao longo do tempo como um marcador da estabilidade do sistema nanoemulsionado (Lakowicz, 2010). Além disso, a manutenção do perfil de fluorescência da Eritrosina antes e após a nanoemulsificação, demonstra que o processo de desenvolvimento da formulação não alterou estas características espectroscópicas do fotossensibilizador mantendo seu perfil fotofísico característico de emissão no UV-visível, sendo, portanto, uma metodologia adequada para incorporar a Eritrosina pois as propriedades espectrais foram preservadas após o processo de nanoemulsificação.

5.3.2 Determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão

O rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) é uma relação entre o número de fótons emitidos e o número de fótons absorvidos pelo fluoróforo (Lakowicz, 2010; Nawara e Waluk, 2017; Zhang, Zhang e Liu, 2014). A determinação do ϕ_f pode ser feita através de diversos métodos, entre eles, o método relativo. Esse método consiste na avaliação do perfil de absorção da molécula seguido da avaliação da emissão de fluorescência e, em seguida, determinado matematicamente a partir dos dados obtidos (Nawara e Waluk, 2017; Zhang, Zhang e Liu, 2014) empregando-se como padrão a Eritrosina solubilizada em etanol (EtOH) contendo $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaOH, com $\phi_f = 0,14$, conforme previamente descrito por (Zhang, Zhang e Liu, 2014).

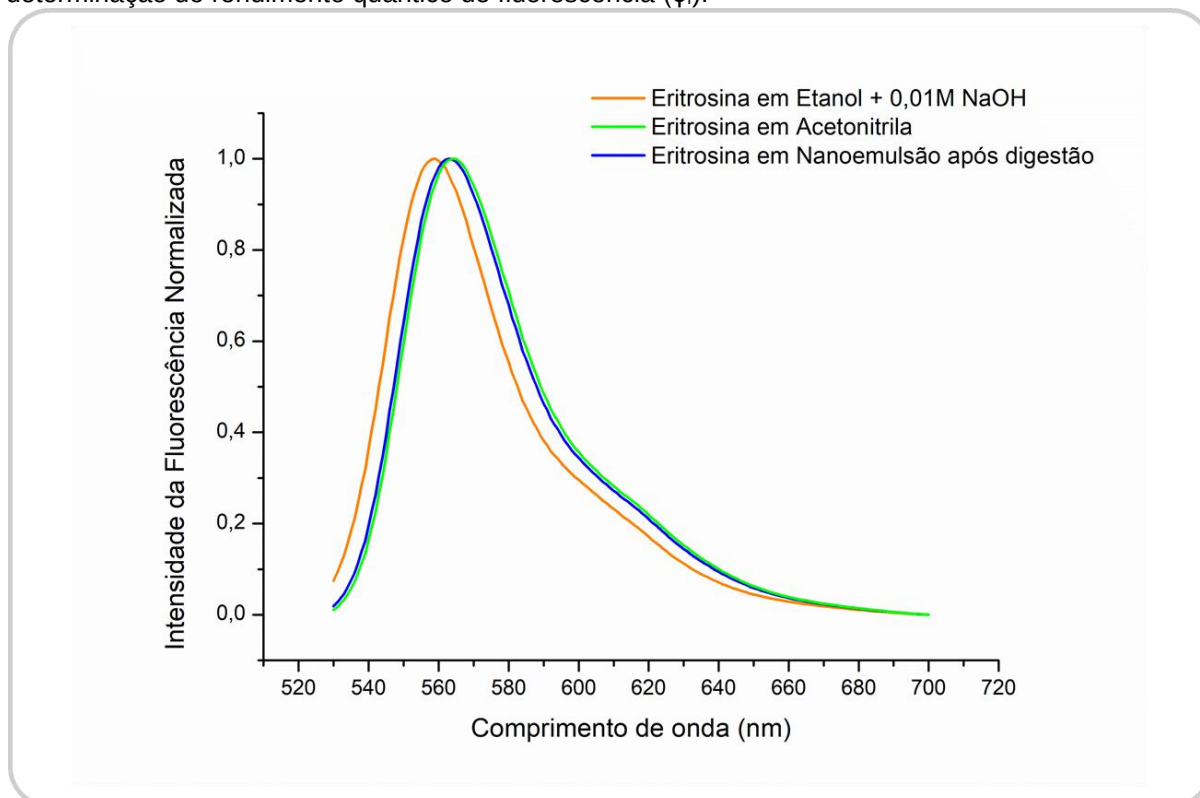
Para a Eritrosina livre e a Eritrosina em nanoemulsão após a digestão, foram utilizados o método relativo e os valores dos ϕ_f encontrados estão descritos na Tabela 23 e a Figura 34 ilustra o perfil de emissão de fluorescência das amostras analisadas.

Tabela 23 – Resultados de rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f) da Eritrosina livre e em nanoemulsão após digestão em ACN

Amostra	ϕ_f	λ_{abs} , nm	λ_{em} , nm
Eritrosina/EtOH	0,14*	500	530
Eritrosina/ACN	0,34	500	530
Eritrosina/NE	0,31	500	530

Fonte: Própria autora. *rendimento padrão conforme obtido por Zhang, Zhang e Liu, 2014.

Figura 34 – Espectros normalizados da emissão de fluorescência bidimensional no UV-visível para a determinação do rendimento quântico de fluorescência (ϕ_f).



Fonte: Própria autora, criando em OriginPro 8.5.

O ϕ_f é muito sensível ao ambiente químico que o fluoróforo se encontra e principalmente à concentração da amostra e ao comprimento de onda de excitação devido ao efeito de auto-absorção, que consiste na própria molécula absorver a energia emitida por ela, também denominado “filtro interno” (Nawara e Waluk, 2017). Para evitar a ocorrência desse efeito, a absorbância das amostras foi mantida em no máximo 0,1 com amostras diluídas no comprimento de onda de excitação.

Substâncias que apresentam alto valor de rendimento quântico de fluorescência, próximo a 1, apresentam um perfil de emissão de fluorescência extremamente brilhante, pois aproximadamente 100% da energia absorvida está sendo dissipada na forma de emissão de fótons, sendo considerados fluoróforo excelentes, podendo ser utilizados como marcadores clássicos (Lakowicz, 2010).

Para a aplicação de moléculas fotossensibilizadoras em TFD é interessante que se tenha um baixo valor de rendimento quântico de fluorescência ou até mesmo uma redução nesta propriedade radioativa, pois assim, há maior possibilidade de transferência de energia via cruzamento intersistemas e consequentemente podendo-se obter maior geração de substâncias reativas de oxigênio e formação de oxigênio singlete via mecanismos fotodinâmicos (Vaccari, 2011).

5.3.3 Determinação do tempo de vida de fluorescência (τ) da Eritrosina livre e da Eritrosina em nanoemulsão

O tempo de vida de fluorescência (τ) é definido como o tempo em que o elétron do fluoróforo permanece no estado excitado, emitindo fluorescência, antes de retornar ao seu estado fundamental (Berezin e Achilefu, 2010). Os valores de τ obtidos para a Eritrosina livre e para a Eritrosina em nanoemulsão estão descritos na Tabela 24.

Tabela 24 – Tempo de vida de fluorescência (τ) para a Eritrosina livre e em nanoemulsão, amplitude percentual (A) e seus parâmetros de ajuste (χ^2).

Amostra	τ (ns)	A (%)	χ^2
EL	18,35	100	1,15
NEE	0,22	100	1,29

Fonte: Própria autora.

O valor de τ é uma propriedade intrínseca do fluoróforo, portanto, não depende do método de aferição, bem como das condições de perturbação, como comprimento de onda de excitação ou a duração de exposição à luz. Além disso, o τ também é um parâmetro independente da intensidade de fluorescência e da concentração do fluoróforo (Berezin e Achilefu, 2010; So e Dong, 2001). Entretanto, esta afirmação só é válida para uma determinada gama de concentrações em que os fluoróforos não interagem. Em altas concentrações, o tempo de vida da fluorescência pode aumentar devido a um processo de reabsorção de fótons e, em concentrações ainda mais elevadas, pode ocorrer a redução do tempo de vida, devido a transferência de energia de ressonância entre dois fluoróforos próximos ou a formação de dímeros não fluorescentes (Berezin e Achilefu, 2010).

Além disso, fatores como variação da temperatura, variação da viscosidade do meio que o fotossensibilizador está disperso e polaridade do meio, interferem diretamente nos tempos de vida de fluorescência (Berezin e Achilefu, 2010). Ademais, a ocorrência de cruzamento intersistemas de um estado singleto para um estado tripleto afeta diretamente o tempo de vida de fluorescência da molécula, podendo reduzir o tempo de vida do estado singleto (Berezin e Achilefu, 2010).

Dessa maneira, o elevado tempo de vida de fluorescência para a Eritrosina livre pode ter sido induzido por uma alta concentração da solução analisada, visto que demais trabalhos descritos na literatura trazem valores de τ similares aos

Fernanda Borges de Almeida

apresentados pela Eritrosina em nanoemulsão (Ibrayev *et al.*, 2024; Mamardashvili *et al.*, 2024; Minami *et al.*, 1986). Sendo assim, se faz necessário mais estudos, avaliando outras concentrações de ambas as amostras para entender melhor o comportamento de τ da Eritrosina livre e em nanoemulsão.

5.4 Caracterização físico-química e morfológica das nanoemulsões

5.4.1 Determinação do diâmetro hidrodinâmico médio por espalhamento dinâmico de luz e potencial Zeta por mobilidade eletroforética

A Tabela 25 ilustra os resultados obtidos para o diâmetro hidrodinâmico médio (DHM), índice de polidispersão (Pdl) e potencial Zeta (PZ) para as nanoemulsões contendo Eritrosina após 24 h armazenadas em estufa, geladeira e ambiente.

Tabela 25 – Diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão e potencial Zeta das nanoemulsões.

Amostra	DHM (nm)	Pdl	PZ (mV)
NEEA	89,49 $\pm$ 0,165	0,13 $\pm$ 0,014	-29,77 $\pm$ 5,400
NEEE	94,11 $\pm$ 1,443	0,16 $\pm$ 0,009	-32,77 $\pm$ 1,800
NEEG	149,5 $\pm$ 3,005	0,23 $\pm$ 0,036	-37,00 $\pm$ 0,361

Fonte: Própria autora.

A distribuição dos tamanhos de gotícula é avaliada utilizando a técnica de espalhamento dinâmico da luz (DLS – do inglês *dynamic light scattering*). Essa técnica de medição óptica quantifica a intensidade de luz espalhada pelo movimento Browniano das gotículas individualmente, ou seja, partículas individuais e agregados ou aglomerados de partículas, e a quantidade de luz espalhada é diretamente proporcional ao diâmetro hidrodinâmico médio das gotículas (Babick, 2020; Bhattacharjee, 2016; Jafari e McClements, 2018).

Além disso, o DLS fornece informações do Pdl, que indica a variedade de populações de gotículas presentes na formulação; ou seja, quanto mais próximo da unidade o valor de Pdl, maior a variabilidade populacional. Sabe-se que, em preparações farmacêuticas, é incomum que as gotículas sejam completamente monodispersas, sendo mais comumente encontrados sistemas polidispersos; entretanto, um sistema com um baixo índice de polidispersão é um sistema mais

estável e, portanto, um gráfico de dispersão monomodal é o desejável (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018).

O PZ é determinado a partir da técnica de mobilidade eletroforética e é utilizado como um parâmetro para avaliação da estabilidade das formulações frente à floculação, ele reflete a diferença de potencial entre a dupla camada elétrica de partículas coloidais a partir que se movem sob um campo elétrico (Bhattacharjee, 2016; Clogston e Patri, 2011). Quando seu valor se encontra superior a 30 mV, em módulo, indica que as forças repulsivas da dupla camada estão atuando com maior intensidade do que as forças atrativas de Van der Waals; assim, há menor tendência à formação de floculado e, conseqüentemente, menor possibilidade de ocorrer coalescência e quebra da emulsão (Aulton, 2016; Friberg, Jansson e Cederberg, 1976; Jafari e McClements, 2018; Mahdi *et al.*, 2011).

5.4.2 Análise de rastreamento de nanopartículas (NTA)

A Tabela 26 ilustra os resultados obtidos para o diâmetro hidrodinâmico (DH), concentração de partículas/mL e índice span para as nanoemulsões contendo Eritrosina após 24 h armazenadas em estufa, geladeira e ambiente.

Tabela 26 – Diâmetro hidrodinâmico, concentração de partículas/mL e índice Span das nanoemulsões.

Amostra	DH (nm)	Concentração de partículas/mL	Índice Span
NEEA	110,0 ± 1,9	5,20·10 ¹² ± 1,83·10 ¹¹	0,378
NEEE	103,4 ± 2,0	4,23·10 ¹² ± 8,12·10 ¹⁰	0,470
NEEG	132,4 ± 3,0	4,26·10 ¹² ± 1,02·10 ¹¹	0,651

Fonte: Própria autora.

Os resultados obtidos através do NTA corroboram os dados apresentados na seção 5.4.1. Os valores do índice span abaixo de uma unidade, são característicos de sistemas monodispersos, o que é consistente com os baixos valores de índice de polidispersão obtidos por DLS.

O NTA consiste em uma técnica que combina a dispersão de luz laser com um microscópio óptico, utilizando as imagens para medir os movimentos aleatórios de partículas individuais.

As imagens são formadas a partir da iluminação de uma suspensão de partículas com uma fina camada de luz (Kestens *et al.*, 2017; Walker, 2012). Devido a isso, as análises de NTA apresentam uma menor sensibilidade à influência da polidispersão. Além disso, a distribuição do tamanho das partículas é uma medida mais direta pois a medição é baseada no rastreamento de partículas individuais e não no ajuste de curvas, como acontece com a DLS (Chan *et al.*, 2017).

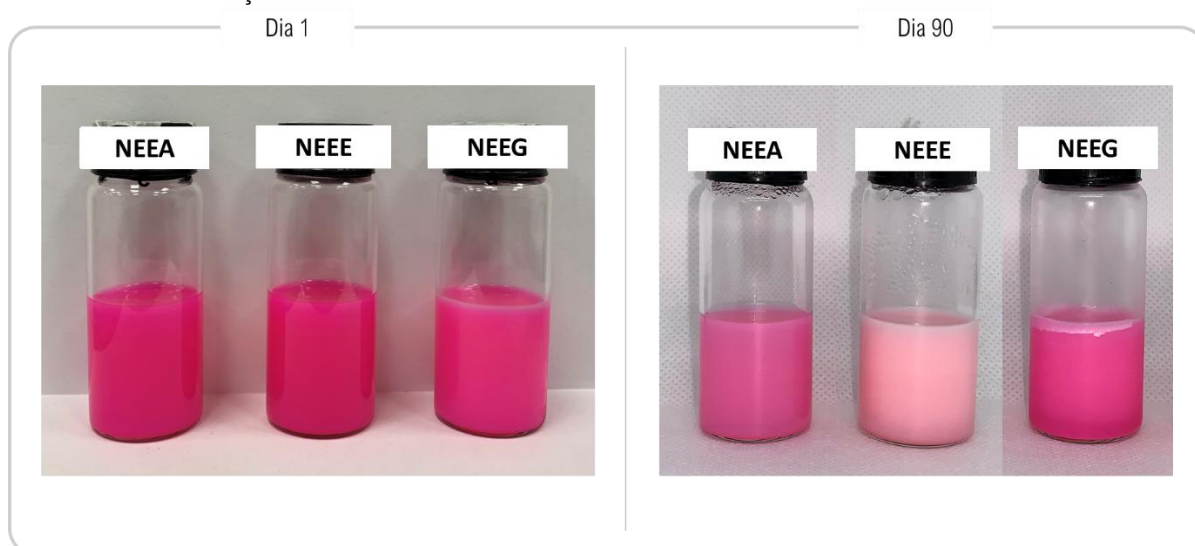
5.4.3 Estudo de estabilidade

5.4.3.1 Influência de diferentes condições de estresse em função do tempo

Após a síntese das nanoemulsões contendo Eritrosina, as formulações foram armazenadas em três condições de estresse e avaliadas quanto a variação do diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersão, potencial Zeta e teor de associação do ativo fotossensibilizador.

A Figura 35 ilustra o aspecto das formulações 24 h após a síntese e após 90 dias de armazenamento sob as diferentes condições de estresse.

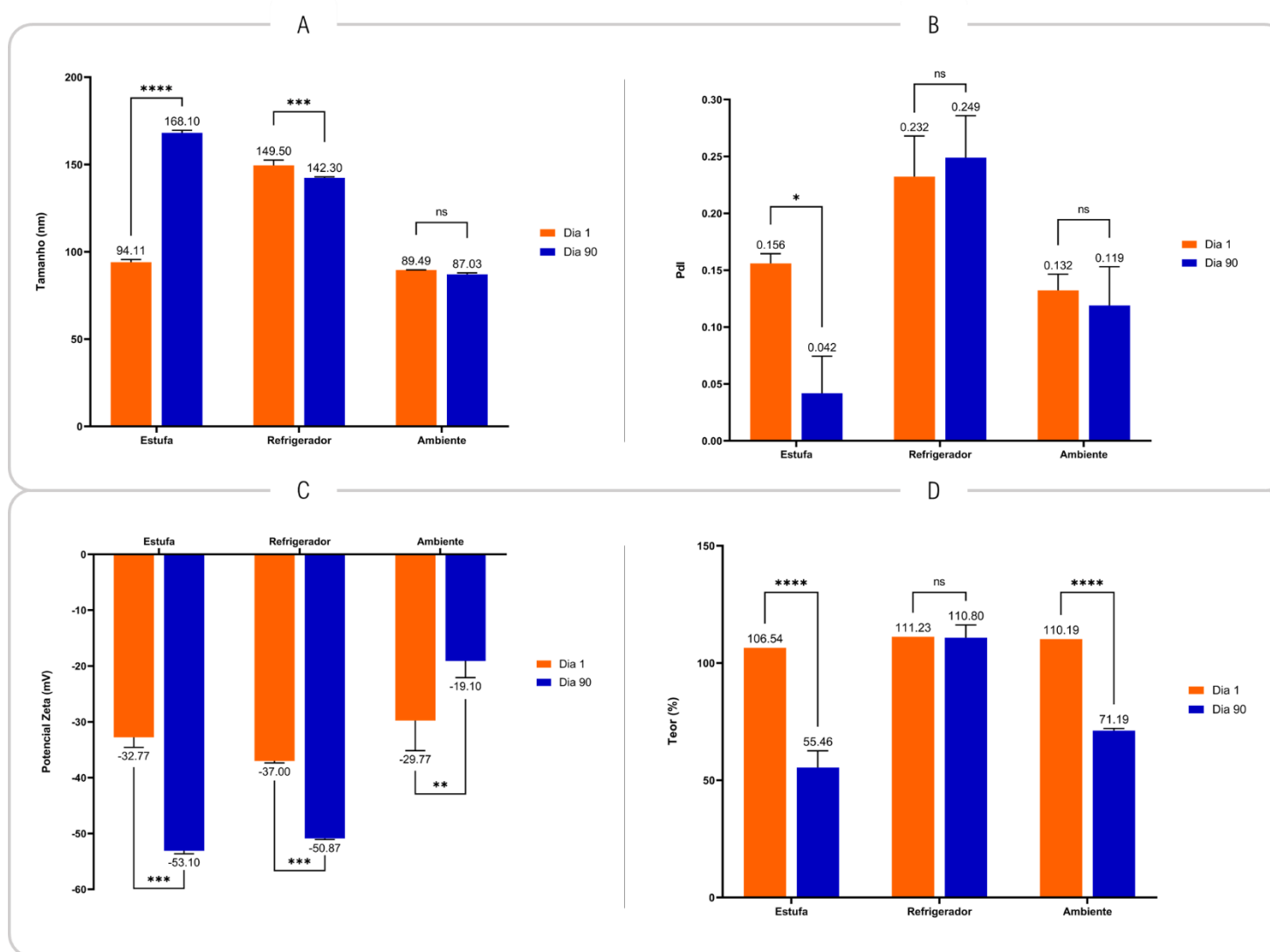
Figura 35 – Nanoemulsões contendo Eritrosina 24 h após a síntese e após 90 dias de armazenamento nas diferentes condições de estresse.



Fonte: Própria autora.

A Figura 36 ilustra os gráficos com as variações dos parâmetros analisados no estudo de estabilidade.

Figura 36 – Resultados dos parâmetros analisados no estudo de estabilidade. Diâmetro hidrodinâmico médio (A); Índice de polidispersão (B); Potencial Zeta (C); Teor de Eritrosina (D).



Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism 9.

Após a análise dos dados obtidos, foi possível concluir que a condição de estresse refrigerador foi a que menor gerou impacto negativo sobre o sistema nanoemulsionado, visto que, embora tenha ocorrido variação significativa no tamanho de gotícula e potencial Zeta, os demais parâmetros se mantiveram inalterados, principalmente em relação ao teor de Eritrosina, que se manteve estável durante os 90 dias de armazenamento.

5.4.3.2 Estudo de estabilidade de longa duração por centrifugação analítica

A Tabela 27 descreve os resultados obtidos para o estudo de longa duração por centrifugação analítica das amostras NEB e NEE.

Tabela 27 – Dados de estabilidade obtidos por centrifugação analítica (LUMiSizer®).

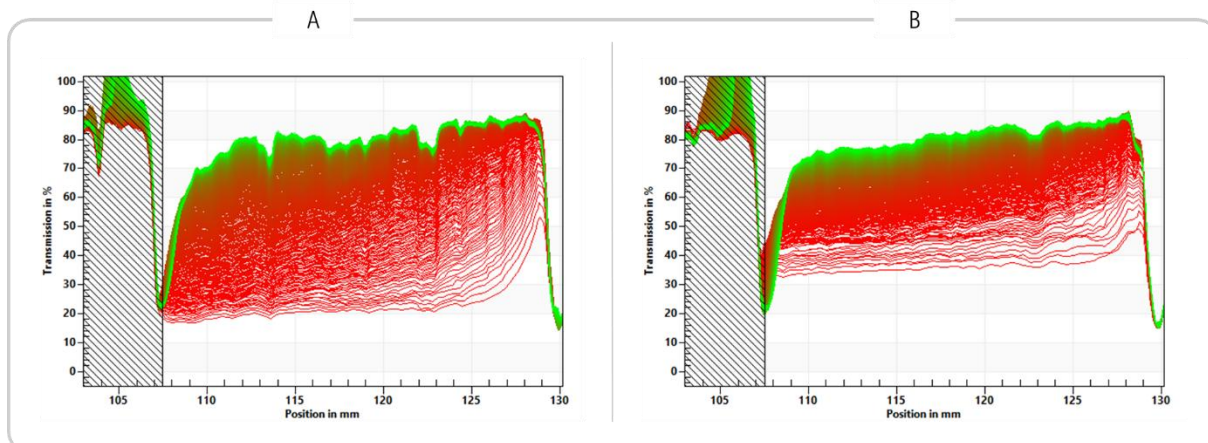
Amostra	<i>Shelf life</i> (meses)	V_s ($\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$)	I_i
NEB	2,4	0,8864	0,788
NEE	2,4	0,0084	0,736

Fonte: Própria autora.

A centrifugação analítica pode ser utilizada para acelerar os processos de instabilidade termodinâmica que naturalmente ocorrem em sistemas nanoemulsionados, como a formação de cremagem, floculação e sedimentação. Isso se deve ao aumento da força gravitacional exercida sobre as amostras devido à alta velocidade de centrifugação, dessa maneira é possível estimar de velocidade de sedimentação e o índice de instabilidade (Chang e Liao, 2016; Lerche e Sobisch, 2011). Esse índice mensura a probabilidade de algum fenômeno de separação ocorrer durante o tempo de prateleira, assim, valores próximos de zero indicam baixa probabilidade de ocorrer a formação de cremagem, sedimentação ou floculação (Chang e Liao, 2016; Lerche e Sobisch, 2011).

Ambas as formulações apresentaram um *shelf life* de 2,4 meses, entretanto, a formulação contendo Eritrosina (NEE) apresentou valores de velocidade de sedimentação e de índice de instabilidade menores, o que pode ser corroborado pelo perfil de transmitância ilustrado na Figura 37.

Figura 37 – Perfil de transmitância da análise de estabilidade por centrifugação analítica (LUMiSizer®) da NEB (A) e da NEE (B).



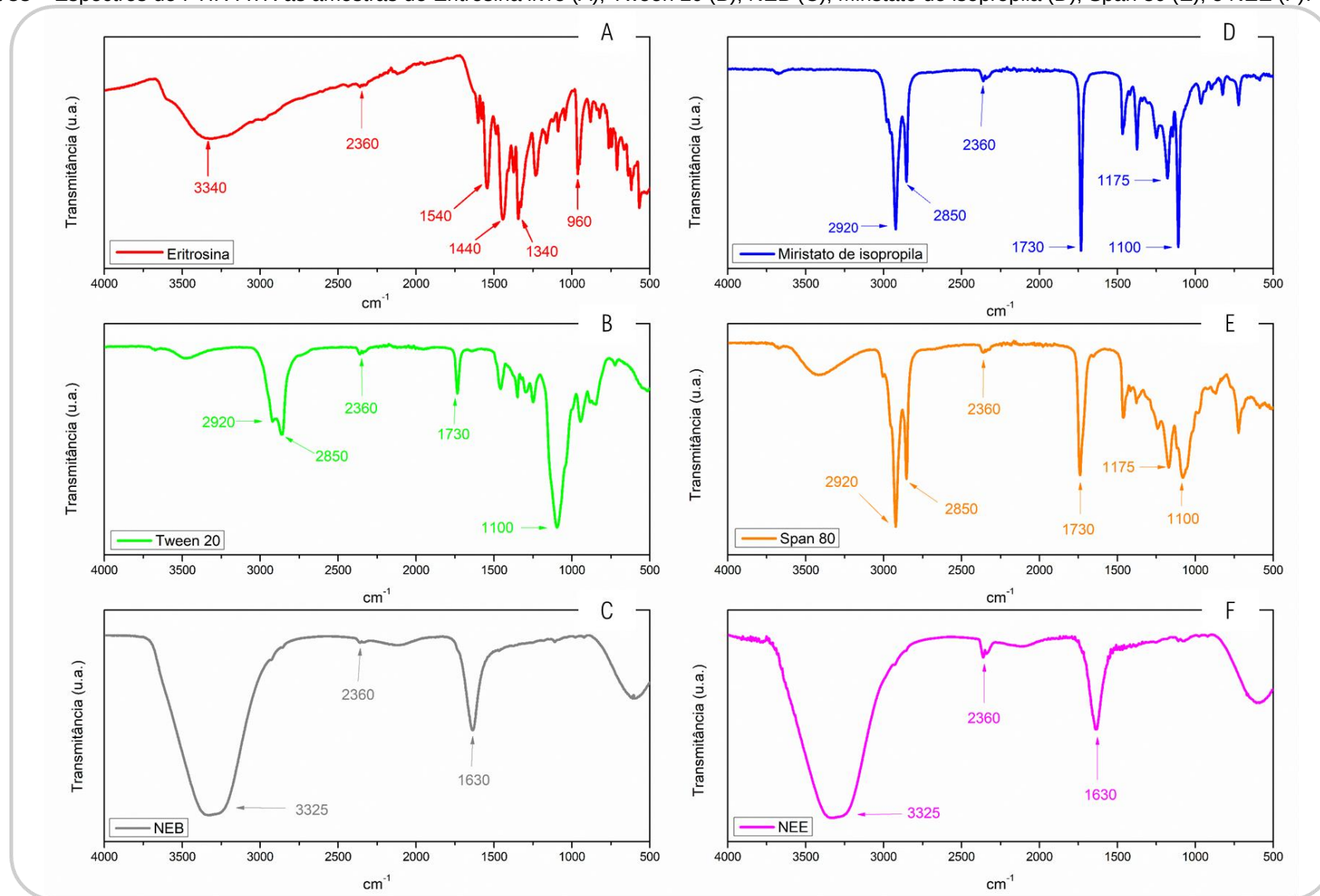
Fonte: Própria autora.

Após a análise dos resultados, é possível inferir que a incorporação da Eritrosina ao sistema nanoemulsionado permitiu uma melhora na estabilidade, visto que ocorreu um estreitamento no perfil de transmitância, sugerindo uma redução na sedimentação (Lerche e Sobisch, 2011).

Embora as amostras tenham apresentado um curto tempo de *shelf life* é preciso destacar que o estudo de estabilidade de longa duração por centrifugação analítica, estima o tempo com base na ocorrência dos parâmetros de instabilidade reversíveis, dessa maneira, a formação de cremagem, sedimentação ou floculação podem ser dispersadas com agitação manual do frasco contendo a formulação.

5.4.4 Análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância atenuada (FTIR-ATR)

A fim de se avaliar a eficiência do processo de nanoemulsificação da Eritrosina e caracterizar estruturalmente o sistema, foi realizada a análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier e reflectância atenuada (FTIR-ATR), a Figura 38 ilustra os espectros de infravermelho.

Figura 38 – Espectros de FTIR-ATR as amostras de Eritrosina livre (A), Tween 20 (B), NEB (C), Miristato de isopropila (D), Span 80 (E), e NEE (F).

Fonte: Própria autora.

Fernanda Borges de Almeida

O espectro de FTIR-ATR da Eritrosina está de acordo com os dados da literatura (ChemicalBook, 2025), demonstrando não haver contaminação do ativo utilizado, sendo, portanto, uma amostra com elevado grau de pureza, apresentando todos os sinais característicos dos grupamentos funcionais presentes em sua estrutura química.

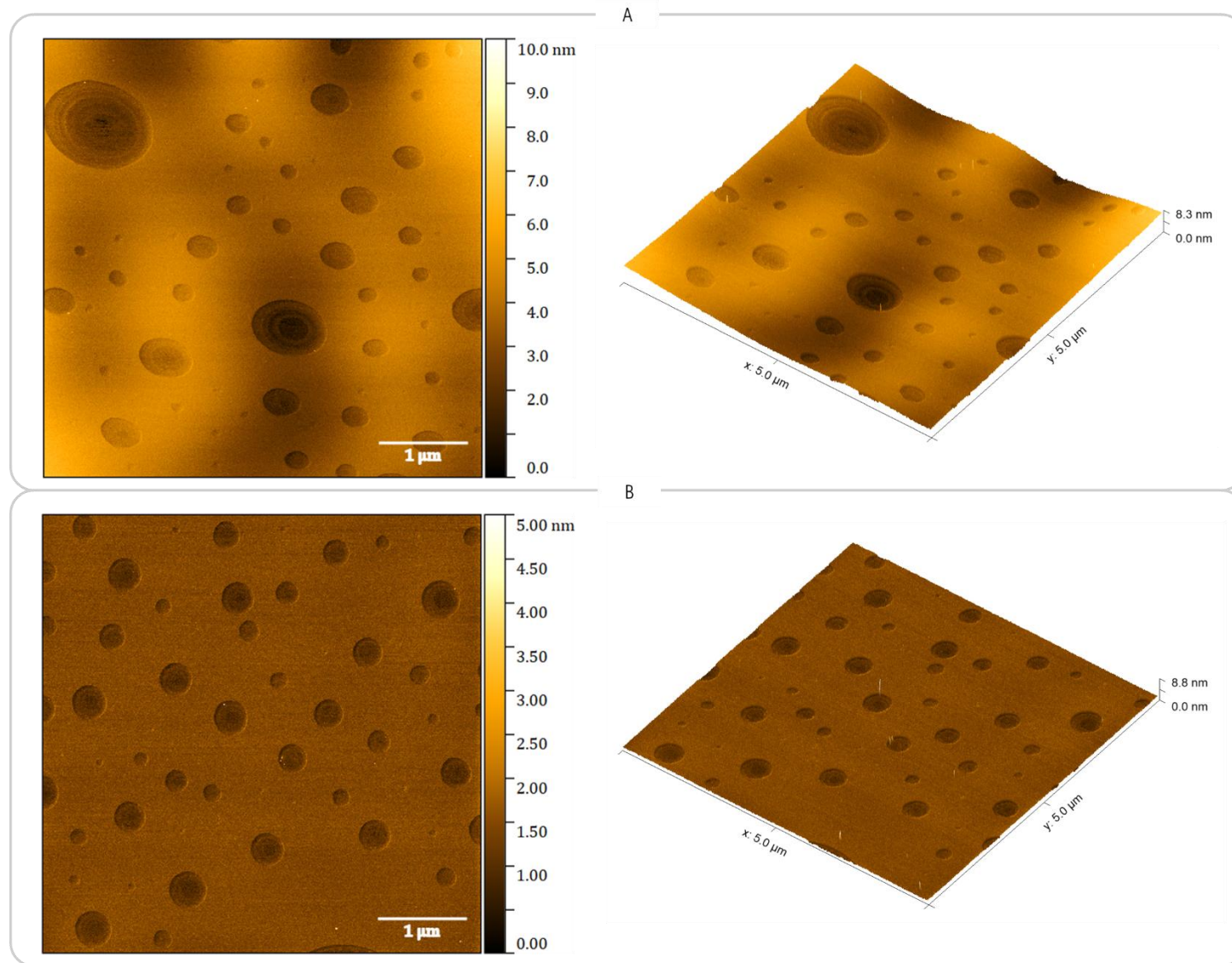
Os estiramentos em 2920 e 2850 cm^{-1} , apresentados nos espectros do miristato de isopropila, tween 20 e span 80, são correspondentes ao sinal de alcano (LibreTexts, 2025). O estiramento em 1730 cm^{-1} , apresentados nos espectros do miristato de isopropila, tween 20 e span 80, correspondem ao sinal de carbonila de grupamento éster, que é um sinal esperado, visto que as três matérias primas apresentam grupo funcional éster na sua estrutura química (LibreTexts, 2025). O estiramento em 1100 cm^{-1} apresentados nos espectros do miristato de isopropila, tween 20 e span 80, correspondem ao sinal do grupamento álcool secundário, presente nas estruturas dos tensoativos tween 20 e span 80. Para o miristato de isopropila, esse estiramento é oriundo também do grupamento éster (LibreTexts, 2025).

Todos os sinais dos grupamentos funcionais característicos das matérias-primas utilizadas na síntese das nanoemulsões estão ausentes nos espectros de NEB e NEE, sugerindo que o processo de nanoemulsificação foi eficiente. Os sinais presentes nos espectros de NEB e NEE em 1630 cm^{-1} são sinais correspondentes à alcenos conjugados, que podem ter se formado a partir da interação química das matérias-primas (LibreTexts, 2025). A banda apresentada na região de 3325 cm^{-1} corresponde ao sinal do grupamento hidroxila, provavelmente oriundo da água, fase externa das nanoemulsões (LibreTexts, 2025).

Em todos os espectros de FTIR apresentados, há um sinal em 2360 cm^{-1} correspondente ao CO_2 ambiental (LibreTexts, 2025).

5.4.5 Microscopia de Força Atômica (AFM)

A Figura 39 ilustra as imagens obtidas por Microscopia de Força Atômica das formulações NEB e NEE.

Figura 39 – Imagens de Microscopia de Força Atômica das formulações NEB (A) e NEE (B).

Fonte: Própria autora.

Fernanda Borges de Almeida

A Microscopia de Força Atômica (AFM) consiste em uma técnica de microscopia que escaneia a superfície do material gerando imagens topográficas, sendo fundamental para a caracterização estrutural de sistemas nanoemulsionados (Ho, Abik e Mikkonen, 2022; Jafari e McClements, 2018). Além disso, é possível avaliar a qualidade da dispersão das gotículas da nanoemulsão (Araujo *et al.*, 2021; Jafari e McClements, 2018).

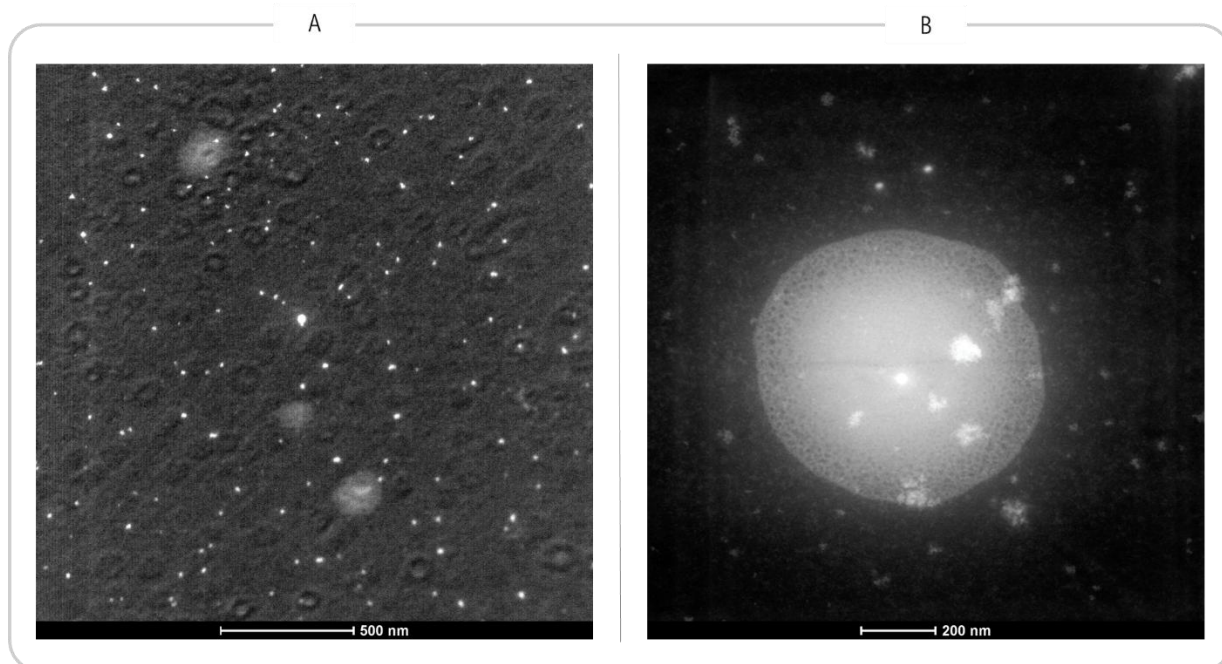
Entretanto, essa técnica apresenta limitações em relação a caracterização interfacial de sistema coloidais emulsionados, visto que ao desidratar as amostras para as análises, os resultados podem ser afetados devido as análises não serem realizadas nos sistemas nanoemulsionados verdadeiros, ou seja, em meio líquido, gerando imagens de esferas achatadas (Ho, Abik e Mikkonen, 2022; Ma, Davidson e Zhong, 2016). Entretanto é possível identificar o aspecto morfológico característico das nanoestruturas, identificado pelo aspecto esférico e com dimensões submicrônicas evidenciados pelo núcleo lipofílico característico destes tipos de sistemas de liberação.

5.4.6 Microscopia Eletrônica de Transmissão

5.4.6.1 Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM)

A Figura 40 ilustra as imagens obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM) para NEB e NEE.

Figura 40 – Imagens de Microscopia Eletrônica de Transmissão e Varredura (STEM) das formulações NEB (A) e NEE (B).



Fonte: Própria autora.

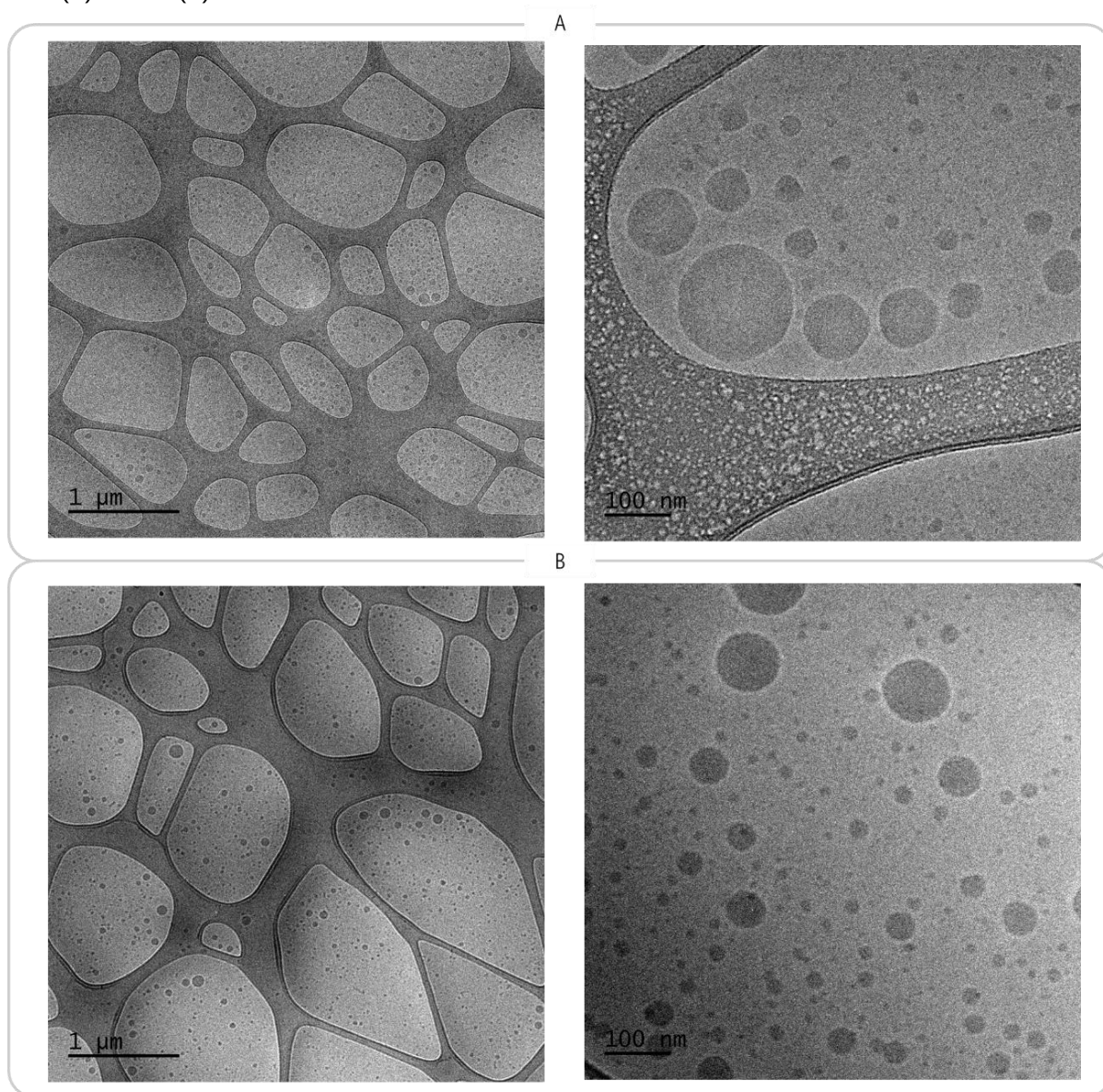
A técnica de microscopia eletrônica consiste na geração de um feixe de elétrons, que é transmitido através de uma amostra suficientemente fina e que seja transparente ao feixe de elétrons (Luo, 2016; Oliveros, 2012). No modo de operação STEM, são utilizadas fontes de elétrons FEG devido as características de resolução que esse feixe confere as imagens geradas pelo microscópio. Em relação aos detectores mais utilizados nesse modo de operação, são os de campo claro, campo escuro anular e campo escuro anular de alto ângulo (Oliveros, 2012).

Após a análise das imagens em campo escuro, foi possível observar a morfologia esférica das gotículas de ambas as nanoemulsões com presente de furos característicos como “corpos de fundo” devido interação com feixe de elétrons. Entretanto, para a formulação NEE o tamanho observado através da técnica de STEM ficou fora da faixa esperada, conforme previamente determinado através das técnicas de DLS e NTA, o que pode ser entendido como possível instabilidade das amostras resultantes do preparo realizado com ausência de recobrimento para estabilização ou melhor resolução da análise.

5.4.6.2 Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM)

A Figura 41 ilustra as imagens de Cryo-TEM obtidas para as nanoemulsões NEB e NEE.

Figura 41 – Imagens de Criomicroscopia Eletrônica de Transmissão (Cryo-TEM) das nanoemulsões NEB (A) e NEE (B).



Fonte: Própria autora.

Conforme apresentado na Figura 41 temos as imagens de Cryo-TEM das formulações preparadas, as quais mais uma vez, foram confirmadas quanto a formação de nanoemulsões, com tamanho de gotícula inferior a 200 nm e com uma boa dispersão das gotículas formadas, tanto para a nanoemulsão vazia, quanto para a nanoemulsão carregada com Eritrosina. Além disso, as imagens mostram a morfologia esférica e com a estrutura lipídica preservada em seu estado coloidal, sem sinais de coalescência ou agregação para ambas as amostras nas duas magnificações apresentadas.

A Criomicroscopia eletrônica de transmissão permite a caracterização direta de coloides no estado vitrificado, congelado e hidratado, com informações sobre a forma, o tamanho e a distribuição das gotículas de nanoemulsão no meio disperso (Klang *et al.*, 2012; Kumar e Mandal, 2018).

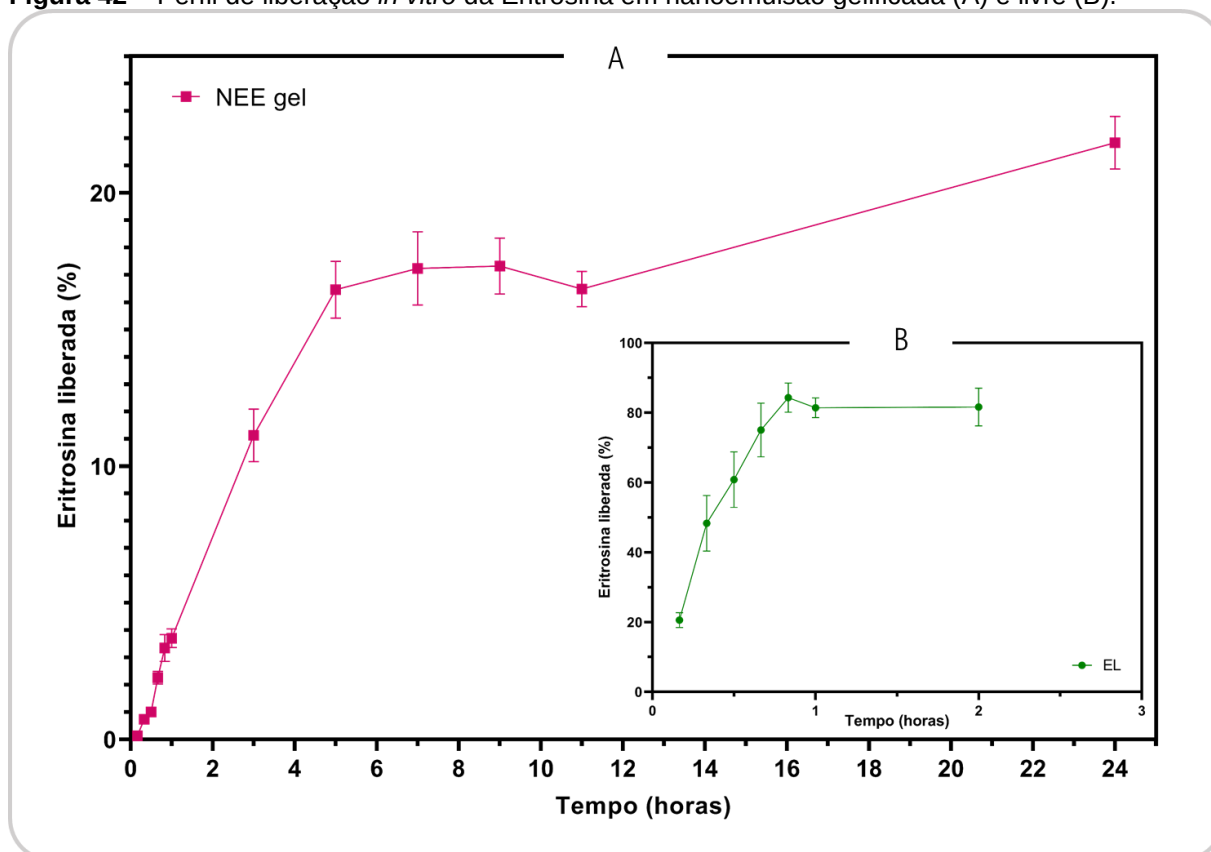
Para isso, é necessário fazer o congelamento da amostra, conforme descrito na seção 4.4.6.2. Esse congelamento ocorre a uma taxa de 1.000.000 K/s, e devido a essa alta velocidade de congelamento, a amostra não possui tempo suficiente para formar gelo cristalino, ao invés disso, ocorre a vitrificação da amostra (Klang *et al.*, 2012; Kuntsche, Horst e Bunjes, 2011).

Esse processo de ultracongelamento permite que as características do líquido sejam preservadas, uma vez que não ocorre a transição de fase exotérmica de primeira ordem entre o líquido e o sólido (Klang *et al.*, 2012; Kuntsche, Horst e Bunjes, 2011). Dessa maneira, a caracterização pode ser realizada com alto nível de resolução espacial (Klang *et al.*, 2012; Kumar e Mandal, 2018; Kuntsche, Horst e Bunjes, 2011).

5.4.7 Determinação do perfil de liberação *in vitro* da Eritrosina da nanoemulsão gelificada em células de Franz

Nanoemulsões são sistemas de liberação desenvolvidos para permitir, além da incorporação de substâncias lipofílicas em água, a modificação do perfil de liberação do fármaco ou ativo encapsulado (Aulton, 2016; Jafari e McClements, 2018; Rebouças *et al.*, 2022).

A Figura 42 ilustra os gráficos dos perfis de liberação *in vitro* obtidos para a Eritrosina em nanoemulsão gelificada e a Eritrosina livre.

Figura 42 – Perfil de liberação *in vitro* da Eritrosina em nanoemulsão gelificada (A) e livre (B).

Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism 9.

Após a análise dos gráficos obtidos, é possível observar uma diferença importante entre os perfis de liberação da Eritrosina. Na Figura 42A observamos que a Eritrosina foi liberada da formulação durante 24 h de análise, atingindo o patamar de apenas 20% de ativo liberado do sistema nanoemulsionado, sugerindo um perfil de liberação sustentada (Marena *et al.*, 2022; Rebouças *et al.*, 2022; Shi *et al.*, 2024). Enquanto em 42B, a Eritrosina atingiu 80% de liberação em apenas 2 h de ensaio. O menor percentual de liberação de Eritrosina da NEEGel em relação à Eritrosina livre pode estar relacionada à interação da Eritrosina com a interface óleo-água da formulação, devido a boa solubilidade do ativo em miristato de isopropila, além da presença da matriz polimérica (Paul, 2011; Rebouças *et al.*, 2022; Siepmann e Peppas, 2011).

A diferença entre os perfis de liberação é um resultado esperado, visto que nanoemulsões gelificadas apresentam a capacidade de reter a liberação do ativo encapsulado, enquanto a Eritrosina livre, por estar completamente solúvel em água e não apresenta nenhuma estrutura que module a sua liberação, estará completamente disponível para atravessar a membrana do sistema de célula de Franz.

Fernanda Borges de Almeida

Para o estudo cinético de liberação foram aplicados cinco modelos matemáticos aos dados da liberação, que são adequados para sistemas nanoemulsionados gelificados (Rebouças *et al.*, 2022). Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 28.

Tabela 28 – Resultado dos diferentes modelos matemáticos para determinar a cinética de liberação da Eritrosina em nanoemulsão gelificada.

Modelo Matemático	R ² ajustado	n
Ordem zero	0,5169	12
Primeira ordem	0,5980	
Korsmeyer-Peppas	0,5243	
Hixson-Crowell	0,5735	
Higuchi	0,8892	

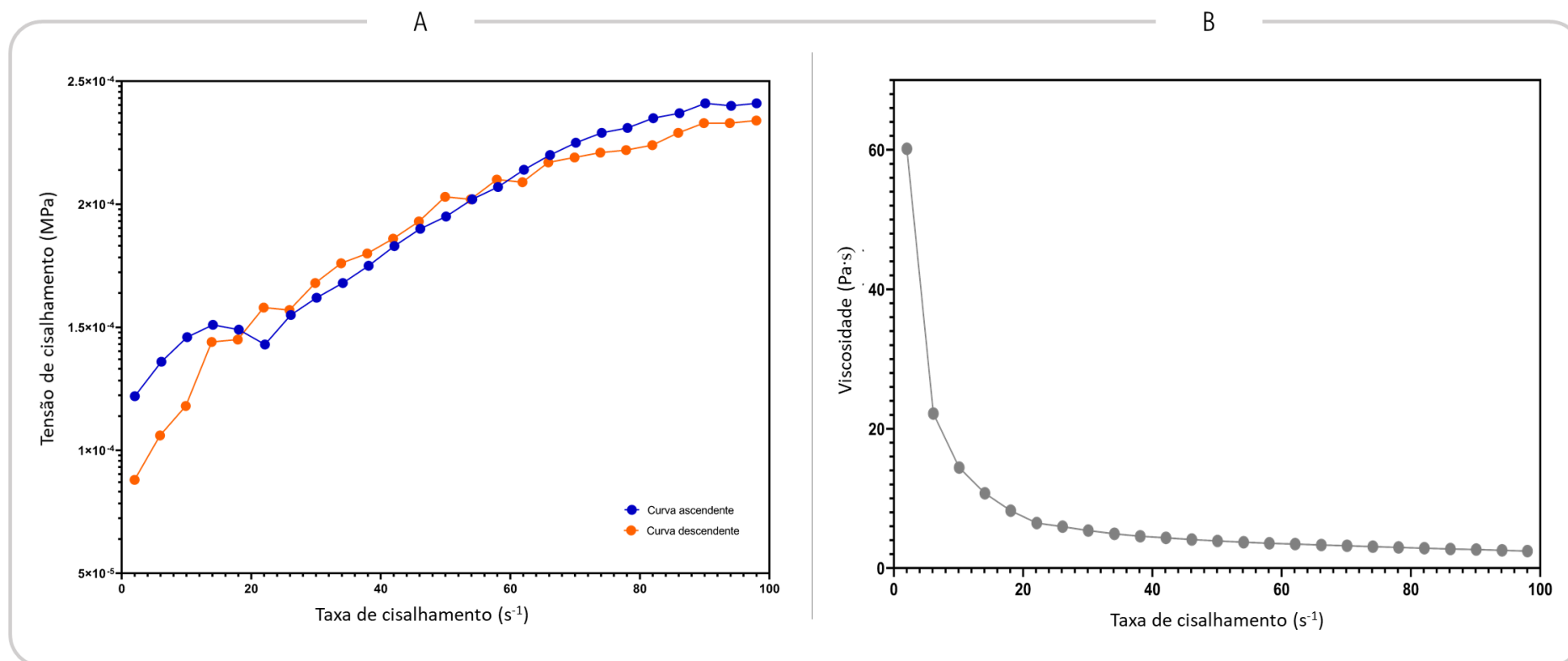
Fonte: Própria autora.

Após a linearização das equações, o valor de R^2 foi determinado, obtendo-se os valores mais próximos de 1 para o modelo matemático de Higuchi. Esse modelo matemático é característico para sistemas de liberação que apresentam matrizes poliméricas (Paarakh *et al.*, 2019; Paul, 2011; Rebouças *et al.*, 2022; Siepmann e Peppas, 2011; Singh, Laverty e Donnelly, 2017).

A cinética de liberação determinada através do modelo de Higuchi descreve a liberação de fármacos de uma matriz insolúvel, como a raiz quadrada de um processo dependente do tempo, baseado na difusão Fick, e isso implica na taxa de liberação diminuir ao longo do tempo, já que a concentração de fármaco na matriz vai diminuindo conforme ocorre a liberação (Paarakh *et al.*, 2019; Paul, 2011; Siepmann e Peppas, 2011).

5.4.8 Reologia da nanoemulsão gelificada

Para a caracterização reológica da nanoemulsão gelificada foram feitos os ensaios de análise de fluxo e ensaio oscilatório de varredura de frequência. Após a análise de fluxo, a viscosidade do material foi determinada como 76,83 Pa.s. A Figura 43 ilustra as curvas de fluxo e de viscosidade para NEEGel.

Figura 43 – Curvas de fluxo (A) e de viscosidade (B) para caracterização reológica de NEEGel.

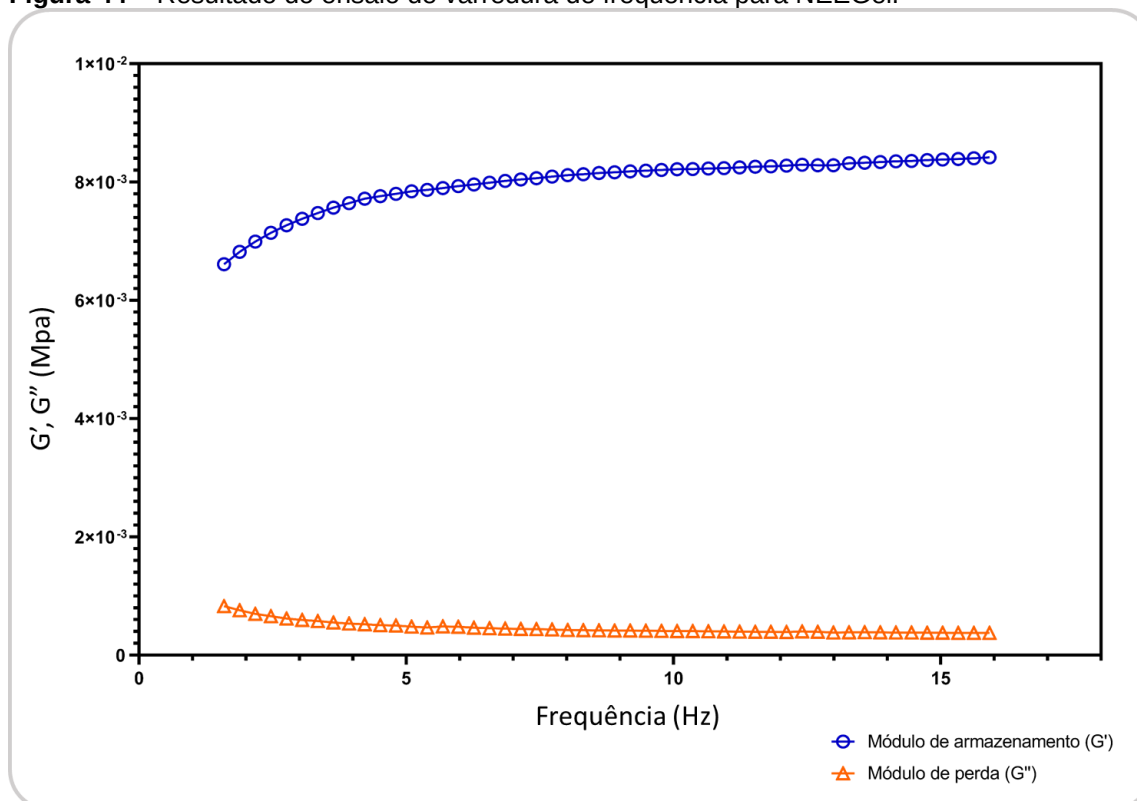
Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism 9.

Após a análise das curvas de fluxo e de viscosidade, é possível caracterizar a nanoemulsão gelificada como um líquido pseudoplástico com limite de escoamento, um tipo de fluido não-Newtoniano (Michels *et al.*, 2023; Ramli *et al.*, 2022; Schramm, 2006). Esses fluidos apresentam uma dependência não linear da viscosidade em relação à taxa ou à tensão de cisalhamento aplicada. Além disso, as curvas de fluxo apresentam um comportamento de iniciarem a uma tensão de cisalhamento maior que zero (Ramli *et al.*, 2022; Schramm, 2006). Ademais, ocorre a redução da viscosidade conforme há o aumento da taxa de cisalhamento, e isso é devido ao cisalhamento ser suficientemente forte para romper as forças de reticulação da rede polimérica (Ramli *et al.*, 2022; Russo e Villa, 2019; Schramm, 2006).

Os polímeros apresentam tipicamente propriedades viscosas e elásticas e têm um comportamento viscoelástico, dessa maneira os ensaios oscilatórios operam na região viscoelástica linear, pois nessa região a deformação é proporcional ao estresse aplicado garantindo que os resultados obtidos sejam representativos do material analisado (Dobraszczyk e Morgenstern, 2003; Ramli *et al.*, 2022).

A Figura 44 ilustra os resultados obtidos para o ensaio de varredura de frequência da formulação.

Figura 44 – Resultado do ensaio de varredura de frequência para NEEGel.



Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism 9.

Fernanda Borges de Almeida

Após a análise do gráfico é possível observar que $G' > G''$ em toda a faixa de frequência analisada, isso ocorre devido a reticulação do polímero se manter estável durante todo o ensaio oscilatório, demonstrando a resistência do material e a dominância do comportamento elástico em relação ao comportamento viscoso (Ibanescu *et al.*, 2010; Komaiko e McClements, 2015b; Ramli *et al.*, 2022).

Os ensaios oscilatórios são utilizados para caracterizar todos os tipos de materiais viscoelásticos, desde líquidos de baixa viscosidade a soluções de polímeros, pastas, géis, elastômeros e até sólidos rígidos (Ramli *et al.*, 2022; Schramm, 2006).

A varredura de frequência é amplamente utilizada como um teste padrão na reologia de polímeros e avalia o comportamento e a estrutura interna do material (Russo e Villa, 2019). Os parâmetros típicos avaliados são o módulo de armazenamento G' , que é uma medida da energia de deformação armazenada pela amostra durante o processo de cisalhamento, representando o comportamento elástico do material e o módulo de perda G'' , que se trata de uma medida da energia de deformação utilizada pela amostra durante o processo de cisalhamento, representando o comportamento viscoso do material (Ramli *et al.*, 2022; Schramm, 2006).

5.4.9 Análise do perfil de textura (TPA) da nanoemulsão gelificada

As características mecânicas texturais avaliadas pela TPA foram a dureza, a compressibilidade, a adesividade e a coesividade. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 29.

Tabela 29 – Resultados da análise do perfil de textura de NEEGel.

Amostra	Dureza (g)	Compressibilidade (g·s)	Adesão (g·s)	Coesão
N1	8,70	36,16	30,03	0,851
N2	10,00	34,74	26,85	0,783
N3	6,10	23,61	17,01	0,763
N4	10,90	33,39	27,54	0,799
N5	6,70	30,37	25,51	0,864
Média ± DP	8,48 ± 2,06	31,65 ± 4,98	25,39 ± 4,97	0,812 ± 0,044

Fonte: Própria autora.

Fernanda Borges de Almeida

Não foram encontrados na literatura dados de análise de TPA para nanoemulsões gelificadas contendo Eritrosina. Entretanto, os resultados descritos na literatura, para dureza, compressibilidade, adesão e coesão, para outras nanoemulsões gelificadas, estão de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho (Fernandes, Souza Ferreira, de e Bruschi, 2023; Riquelme *et al.*, 2023; Souza Ferreira, de *et al.*, 2024; Zhang *et al.*, 2022).

A dureza indica a resistência do material à deformação frente a força realizada para a sonda penetrar na amostra. A compressibilidade é o trabalho requerido para deformar a amostra durante o primeiro ciclo de compressão. A adesão está relacionada ao trabalho requerido da amostra para vencer as forças atrativas entre a amostra e a sonda do equipamento. Já a coesão é a razão entre as áreas da segunda e primeira compressão, que demonstra a capacidade de recuperação estrutural da amostra após sofrer uma deformação (Cui *et al.*, 2022; İlbasmiş Tamer *et al.*, 2023; Riquelme *et al.*, 2023).

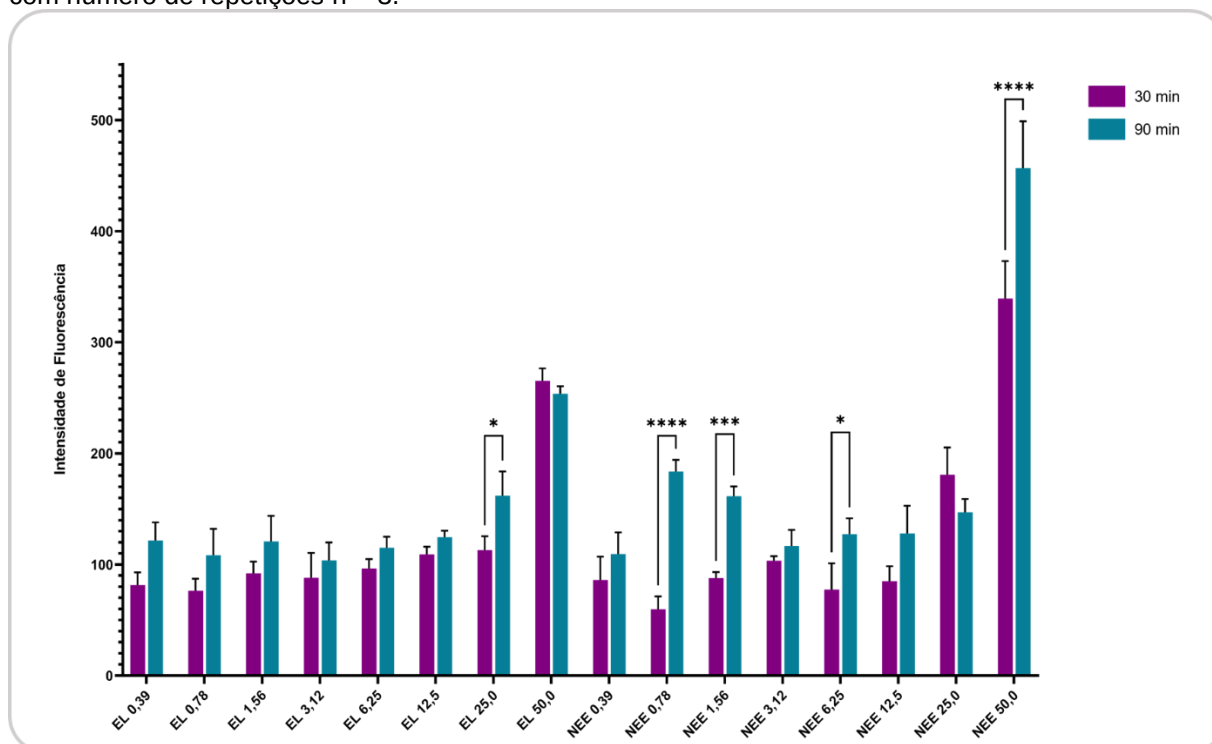
5.5 Cultura celular

5.5.1 Avaliação da internalização celular (UPTAKE)

A Eritrosina apresenta emissão de fluorescência entre 520 nm e 630 nm, com intensidade máxima em 550 nm. Nesse contexto, foi avaliada a internalização celular da Eritrosina livre e em nanoemulsão em HDFn, através da avaliação da intensidade de fluorescência em 550 nm, após completa remoção de qualquer interferente através da lavagem dos poços com solução PBS.

Os resultados obtidos para avaliação da internalização celular da Eritrosina estão expressos na Figura 45.

Figura 45 – Ensaio de internalização celular em HDFn da Eritrosina livre e em nanoemulsão em diferentes concentrações e tempos de incubação. Os efeitos estatísticos foram analisados empregando-se o método ANOVA seguido do pós-teste Šídák para múltiplas comparações ($p > 0,05^*$) com número de repetições $n = 3$.



Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism 9.

Após a análise dos resultados, é possível observar que a internalização da Eritrosina livre e em nanoemulsão foi mais efetiva nas maiores concentrações avaliadas. Entretanto, para a Eritrosina livre não houve diferença estatística significativa entre os dois tempos de tratamento analisados, enquanto para NEE a internalização após 90 min de tratamento foi maior e com significância estatística.

A avaliação da internalização celular de um ativo fotossensibilizador é de extrema relevância, visto que para ocorrer os processos fotodinâmicos, que induzem a morte celular, é necessário que o ativo esteja incorporado ao citoplasma celular (Candido *et al.*, 2018a; Garapati *et al.*, 2015).

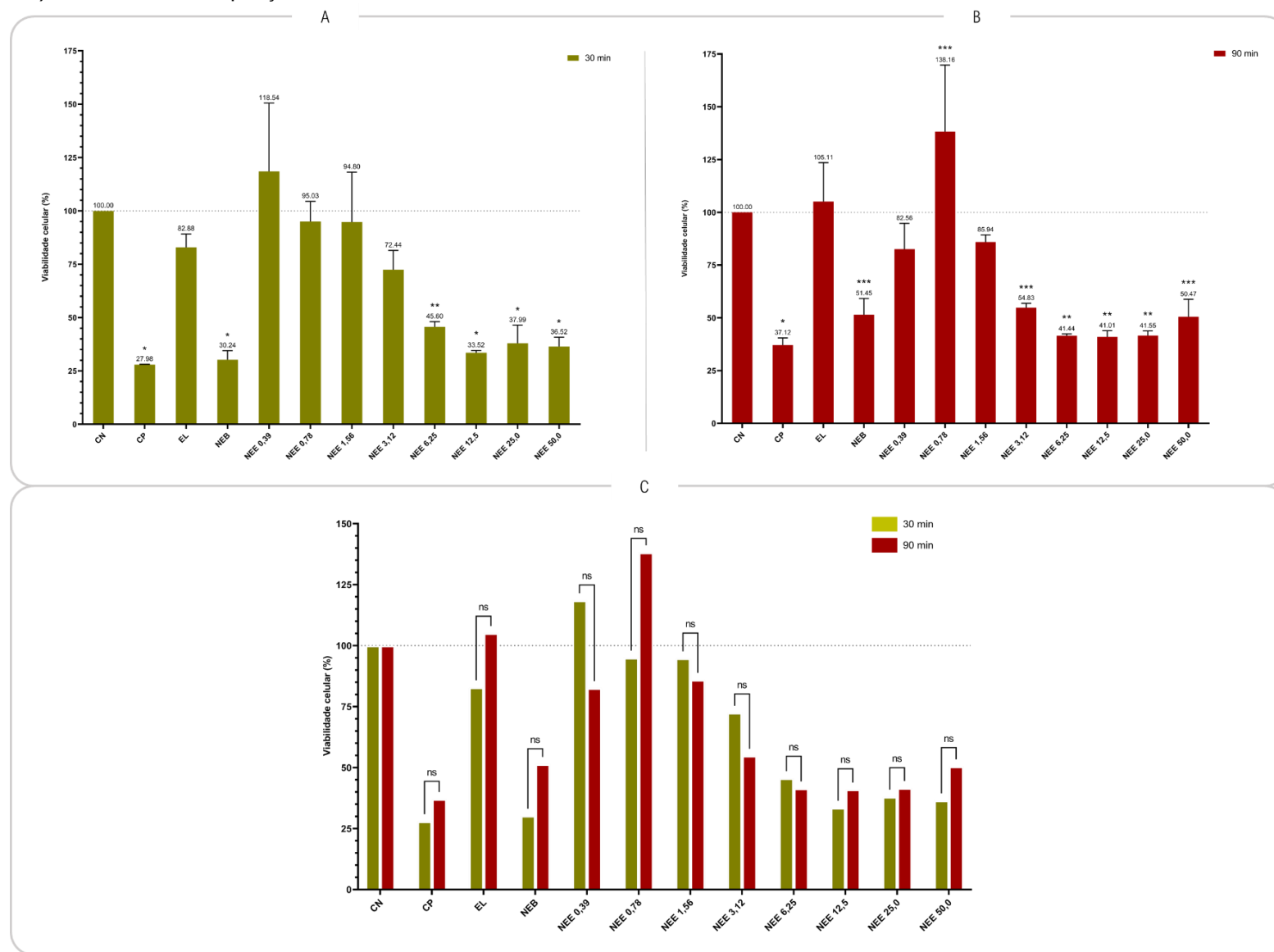
Os ensaios de cultura celular foram conduzidos utilizando tempos de incubação de 30 e 90 minutos. Estes tempos são relativamente reduzidos e foram determinados a partir dos testes de segurança, ensaios prévios de citotoxicidade, e com o intuito de se correlacionar com a necessidade de minimizar o tempo de sedação do paciente durante a cirurgia de ressecção tumoral. Essa abordagem visa garantir a obtenção de resultados biológicos relevantes dentro de um período que não prolongue

excessivamente o procedimento cirúrgico, reduzindo potenciais riscos associados à anestesia prolongada e contribuindo para a segurança do paciente.

5.5.2 Avaliação da atividade citotóxica das nanoemulsões em cultura celular 2D com a linhagem celular HDFn

Após a determinação da melhor nanoemulsão contendo Eritrosina, foi realizada a avaliação da atividade citotóxica em cultura celular em monocamada 2D com a linhagem celular HDFn seguindo as normativas descritas previamente com base na ISO 10993-5, com modificações. Os resultados obtidos estão apresentados com os valores da viabilidade celular percentual para cada grupo experimental conforme ilustrado na Figura 46.

Figura 46 – Resultados do ensaio de viabilidade celular em HDFn após 30 min de tratamento com Eritrosina (EL), NEB e NEE (A), após 90 min de tratamento (B) e a comparação entre os dois tempos de tratamento (C). Os efeitos estatísticos foram analisados empregando-se o método ANOVA seguido do pós-teste Dunnett para múltiplas comparações ($p > 0.05^*$) com número de repetições $n = 3$.



Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism 9.

Após a análise dos resultados obtidos, é possível determinar que somente as concentrações acima de $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram citotóxicas para a linhagem HDFn em ambos os tempos de tratamento. Além disso, quando analisamos a diferença entre os tempos e observamos que não houve diferença estatística significativa em nenhuma das concentrações avaliadas, embora a internalização celular tenha sido mais efetiva após 90 min de tratamento.

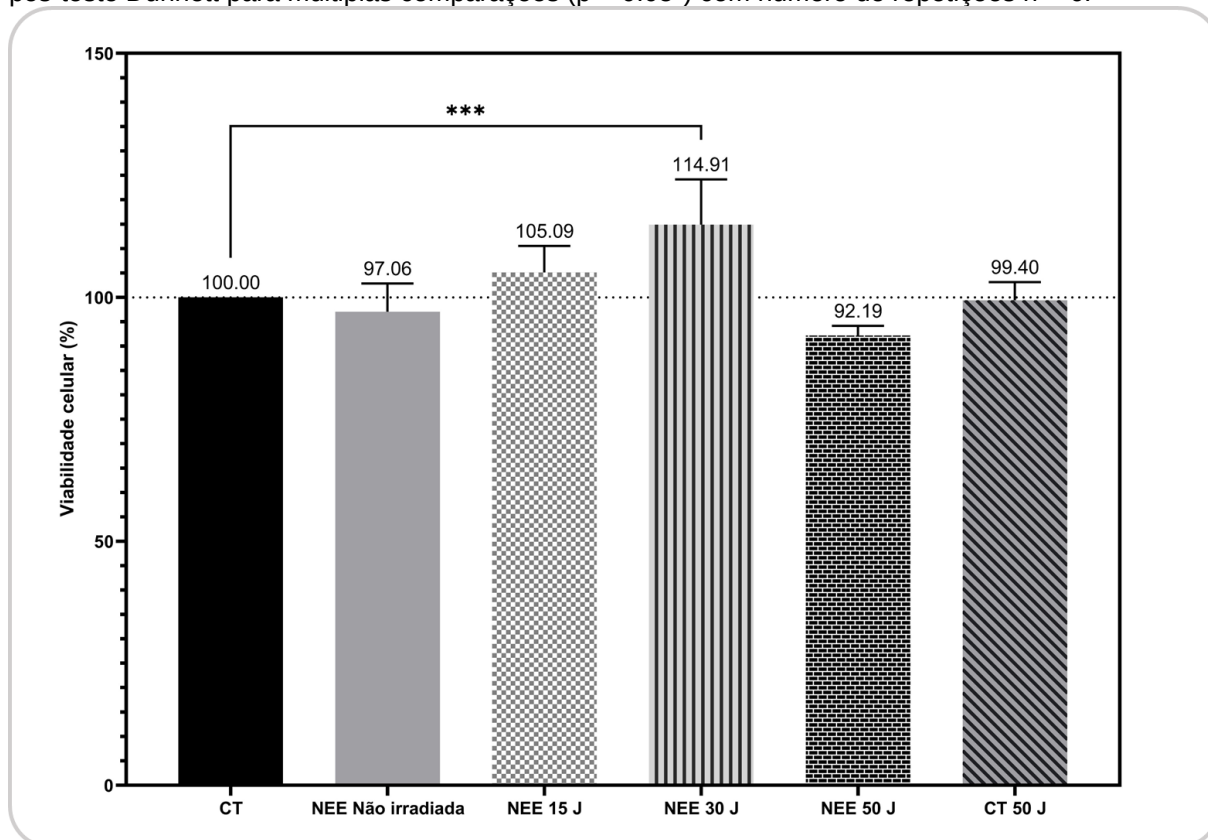
Os fibroblastos humanos imortalizados são uma linhagem de células aderentes isoladas do prepúcio neonatal, amplamente utilizada como um modelo experimental para avaliação da segurança dos mais diferentes tipos de biomateriais, fármacos e medicamentos (ATCC, 2025).

O ensaio utilizando resazurina, como revelador, apresenta mecanismo de ação através da redução da resazurina, azul, em resorufina, rosa e fluorescente. Apenas as células viáveis irão apresentar a capacidade de metabolizar as substâncias. A quantificação da viabilidade celular foi realizada através da determinação da emissão fluorescência em espectrofluorímetro (Mello *et al.*, 2020).

5.5.3 Ensaios de eficácia baseado na atividade fotodinâmica das nanoemulsões *in vitro* em cultura celular 2D com a linhagem celular T98-G

Com base nos dados obtidos no ensaio de avaliação da citotoxicidade da nanoemulsão, a concentração de $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foi determinada como a mais promissora para a avaliação da atividade fotodinâmica frente a linhagem celular de GBM T98-G. A Figura 47 ilustra os resultados obtidos nesse ensaio após a administração das doses/fluências de 15, 30 e $50 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$.

Figura 47 – Resultados obtidos no ensaio de TFD *in vitro* usando NEE ($1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), após 90 minutos de incubação, em células de GBM da linhagem T98-G sob fotoativação nas doses/fluências de 15, 30 e 50 J/cm^2 , empregando-se o sistema Fotopolimerizador Optilight Max calibrado em 500 nm. CT = controle somente células sem fotoativação e formulação; CT 50 J = somente fotoativação na maior dose/fluência. Os efeitos estatísticos foram analisados empregando-se o método ANOVA seguido do pós-teste Dunnett para múltiplas comparações ($p > 0.05^*$) com número de repetições $n = 6$.



Fonte: Própria autora, criado em GraphPad Prism 9.

Ao analisar os dados obtidos no ensaio de avaliação da atividade fotodinâmica é possível observar que para estes tempos de incubação e concentração fixa de formulação não ocorreu indução da morte celular, estatisticamente significativa, para nenhuma das doses de luz avaliadas.

Nanoemulsões são sistemas carreadores de fármacos amplamente utilizados na terapia fotodinâmica (Aldoghachi *et al.*, 2022; Amaral, do *et al.*, 2022; Bonfim *et al.*, 2020; Candido *et al.*, 2018b; Moghassemi *et al.*, 2022), assim como a Eritrosina também apresenta resultados promissores, descritos na literatura, como um ativo fotossensibilizador (Bergmann *et al.*, 2021b; Claudia Pedrozo da Silva *et al.*, 2022b; Costa *et al.*, 2011; Garapati *et al.*, 2015; Gonçalves *et al.*, 2021; Luo, Zhang e Chen, 2024).

Entretanto estudos preliminares demonstraram que células tumorais de glioblastomas em estágios grau IV podem apresentar resistência superior a determinados procedimentos terapêuticos devido baixa internalização. Dessa

Fernanda Borges de Almeida

maneira, se faz necessário avaliar diferentes concentrações de formulação e maiores tempos de incubação para eficácia terapêutica, além de outras linhagens celulares de GBM.

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

A partir dos resultados descritos nesse trabalho, conclui-se que foi possível desenvolver uma nanoemulsão utilizando método de baixo aporte de energia, contendo $0,1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Eritrosina incorporada à fase orgânica (DHM: 127,4 nm; Pdl: 0,16; PZ: -34,6 mV), com uma elevada taxa de associação do ativo fotossensibilizador ao sistema nanoemulsionado. Além disso, também foi possível avaliar a influência de diferentes tensoativos sobre o processo de nanoemulsificação e determinar a região de formação de nanoemulsões no diagrama de fases pseudoternário.

Após a etapa de desenvolvimento da formulação, foi realizada uma ampla caracterização fotofísica da Eritrosina livre e em nanoemulsão a partir da determinação do perfil de absorção e de emissão de fluorescência no UV/Vis por espectrofotometria, seguido da determinação do rendimento quântico de fluorescência (EL: 0,34; NEE: 0,31) e da determinação do tempo de vida de fluorescência (EL: 18,35 ns; NEE: 0,22 ns).

Em seguida, as nanoemulsões foram submetidas a uma extensa caracterização físico-química e morfológica. A formulação foi submetida a diferentes condições de estresse ambiental e demonstrou ser estável durante 90 dias, quando armazenada em refrigerados. Além disso, foi possível determinar em 2,4 meses o *shelf-life* das nanoemulsões, após o ensaio no equipamento LUMiSizer®.

A caracterização morfológica foi realizada utilizando diferentes técnicas de microscopia e, em todas, foi possível confirmar a formação de sistemas nanoemulsionados com uma distribuição homogênea do tamanho das gotículas. Ademais, as nanoemulsões foram caracterizadas quanto ao seu perfil reológico e de textura, e os resultados obtidos estão em consonância com os dados descritos na literatura para esse tipo de material nanoestruturado. Além disso, foi feita a determinação do perfil de liberação da Eritrosina da nanoemulsão gelificada, que apresentou um perfil de liberação sustentada e com cinética de liberação seguindo o modelo de Higuchi, que é um modelo característico para sistemas de liberação que apresentam matrizes poliméricas.

Por fim, foram realizados ensaios biológicos *in vitro* a fim de se avaliar a eficácia e a segurança da nanoemulsão. Para isso, foi avaliado o percentual de internalização celular da nanoemulsão em dois tempos diferentes de incubação, 30 e 90 min. Esse

ensaio demonstrou que a internalização da nanoemulsão foi maior e com significância estatística, após 90 min de tratamento. Na sequência, foi realizada a avaliação da citotoxicidade da nanoemulsão em diferentes concentrações e foi determinado que somente as concentrações acima de $1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ foram citotóxicas para a linhagem HDFn em ambos os tempos de tratamento (30 e 90 min).

Para avaliar a eficácia, foi realizado um ensaio baseado na atividade fotodinâmica das nanoemulsões *in vitro* em cultura celular 2D com a linhagem celular T98-G. Após 90 minutos de incubação com a nanoemulsão ($1,56 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), seguido da fotoativação nas doses/fluências de 15, 30 e $50 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$, foi possível observar que, para estes tempos de incubação e concentração fixa de formulação, não ocorreu indução da morte celular, estatisticamente significativa, para nenhuma das doses de luz avaliadas. Nesse contexto, mais estudos são necessários para avaliar a atividade fotodinâmica com NEE, sendo necessário apreciar diferentes doses de luz, concentrações de formulação e linhagens celulares tumorais diferentes.

Portanto, os resultados apresentados nesta tese contribuirão significativamente para a ampliação do conhecimento sobre sistemas nanoemulsionados obtidos por baixo aporte energético, sem o uso de solventes orgânicos ou aquecimento, com ou sem Eritrosina em sua composição. Além disso, fortalecerão a compreensão dos processos fotodinâmicos como alternativas promissoras para o tratamento complementar do GBM.

REFERÊNCIAS

AHMED, K. *et al.* Nanoemulsion- and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 799–807, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.11.039>. Acesso em: 2 abr. 2025.

AIRES-FERNANDES, M. *et al.* Tissue Engineering and Photodynamic Therapy: A New Frontier of Science for Clinical Application -An Up-To-Date Review. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 10, 15 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.837693>. Acesso em: 2 abr. 2025.

AIRES-FERNANDES, M. *et al.* Development of Biotechnological Photosensitizers for Photodynamic Therapy: Cancer Research and Treatment—From Benchtop to Clinical Practice. **Molecules**, v. 27, n. 20, p. 6848, 13 out. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules27206848>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ALDOGHACHI, A. F. *et al.* Recent Advances in the Therapeutic Strategies of Glioblastoma Multiforme. **Neuroscience**, v. 491, p. 240–270, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2022.03.030>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 152, p. 63–82, ago. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.05.005>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ALMAMMADOV, T. *et al.* Locked and Loaded: β -Galactosidase Activated Photodynamic Therapy Agent Enables Selective Imaging and Targeted Treatment of Glioblastoma Multiforme Cancer Cells. **ACS Applied Bio Materials**, 31 ago. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00484>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ALMEIDA, F. *et al.* Influence of different surfactants on development of nanoemulsion containing fixed oil from an Amazon palm species. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 643, p. 128721, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2022.128721>. Acesso em: 2 abr. 2025.

AMARAL, S. R. *et al.* Advanced methylene blue — nanoemulsions for in vitro photodynamic therapy on oral and cervical human carcinoma. **Lasers in Medical Science**, v. 37, n. 9, p. 3443–3450, 12 jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10103-022-03603-2>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ANJUM, K. *et al.* Current status and future therapeutic perspectives of glioblastoma multiforme (GBM) therapy: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 92, p. 681–689, ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.125>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2008.02.007>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ARAUJO, T. D. S. *et al.* Nanoemulsion of cashew gum and clove essential oil (*Ocimum gratissimum* Linn) potentiating antioxidant and antimicrobial activity.

International Journal of Biological Macromolecules, v. 193, p. 100–108, dez. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.09.195>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ATCC. **Primary Dermal Fibroblast Normal; Human, Neonatal (HDFn)**. Disponível em: <https://www.atcc.org/products/pcs-201-010>. Acesso em: 14 jan. 2025.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química - Questionando a Vida Moderna e o Meio Ambiente**. 3. ed. [s.l.] Bookman, 2006.

AULTON, M. E.; TAYLOR, K. M. G. **Delineamento de Formas Farmacêuticas**. 4. ed. Elsevier, 2016.

BABICK, F. Dynamic light scattering (DLS). In: BABICK, F. **Characterization of Nanoparticles**. Elsevier, 2020. p. 137–172. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-814182-3.00010-9>. Acesso em: 2 abr. 2025.

BARRETO, S. M. A. G. *et al.* Evaluation of in vitro and in vivo safety of the by-product of Agave sisalana as a new cosmetic raw material: Development and clinical evaluation of a nanoemulsion to improve skin moisturizing. **Industrial Crops and Products**, v. 108, n. June, p. 470–479, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.064>. Acesso em: 2 abr. 2025.

BEREZIN, M. Y.; ACHILEFU, S. Fluorescence Lifetime Measurements and Biological Imaging. **Chemical Reviews**, v. 110, n. 5, p. 2641–2684, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr900343z>. Acesso em: 2 abr. 2025.

BERGMANN, E. V. *et al.* Photoactivation of Erythrosine in simulated body fluids. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 259, p. 119867, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119867>. Acesso em: 2 abr. 2025.

BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337–351, ago. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.06.017>. Acesso em: 2 abr. 2025.

BONFIM, C. M. *et al.* Antiviral activity of curcumin-nanoemulsion associated with photodynamic therapy in vulvar cell lines transducing different variants of HPV-16. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 48, n. 1, p. 515–524, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1080/21691401.2020.1725023>. Acesso em: 2 abr. 2025.

BONIFÁCIO, B. V. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1–15, 2014. DOI: <https://doi.org/10.2147/ijn.s52634>. Acesso em: 2 abr. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 166, de 24 de julho de 2017. Brasília, DF, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2017/rdc0166_24_07_2017.pdf. Acesso em: 2 abr. 2025.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Farmacopeia Brasileira. 6ª ed. Brasília, DF, v. 1, 2019a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Guia de Estudos de Estabilidade. Brasília, DF, 2019b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas de Tumor Cerebral no Adulto. Brasília, DF, 2020.

BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ, 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria SECTICS/MS nº 46, de 5 de setembro de 2023. Brasília, DF, 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo de Uso Terapia Fotodinâmica para o Tratamento de Carcinoma Basocelular Superficial e Nodular. Brasília, DF, 2024.

CALORI, I. R. *et al.* Verteporfin self-aggregates in glioblastoma multiforme cells: A static and time-resolved fluorescence study. **Dyes and Pigments**, v. 182, p. 108598, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108598>. Acesso em: 2 abr. 2025.

CANDIDO, N. M. *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. DOI: <https://doi.org/10.1166/jbn.2018.2558>. Acesso em: 2 abr. 2025.

CHAN, M. Y. *et al.* Particle Sizing of Nanoparticle Adjuvant Formulations by Dynamic Light Scattering (DLS) and Nanoparticle Tracking Analysis (NTA). In: Fox, C. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, New York, NY, 2016. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6445-1_17. Acesso em: 2 abr. 2025.

CHANG, C.-W.; LIAO, Y.-C. Accelerated Sedimentation Velocity Assessment for Nanowires Stabilized in a Non-Newtonian Fluid. **Langmuir**, v. 32, n. 51, p. 13620–13626, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.langmuir.6b03602>. Acesso em: 2 abr. 2025.

CHEMICALBOOK. **ERYTHROSIN B (16423-68-0) IR1**. Disponível em: https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_16423-68-0_IR1.htm. Acesso em: 9 jan. 2025.

CLAUDIA PEDROZO DA SILVA, *et al.* Biotin-functionalized silica nanoparticles loaded with Erythrosine B as selective photodynamic treatment for Glioblastoma Multiforme. **Journal of Molecular Liquids**, v. 345, p. 117898, jan. 2022a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2021.117898>. Acesso em: 2 abr. 2025.

CLOGSTON, J.D., PATRI, A.K. Zeta Potential Measurement. In: McNeil, S. Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. **Methods in Molecular Biology**. Humana Press, 2011. DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-60327-198-1_6. Acesso em: 2 abr. 2025.

COSTA, A. C. B. P. *et al.* Susceptibility of *Candida albicans* and *Candida dubliniensis* to erythrosine- and LED-mediated photodynamic therapy. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 11, p. 1299–1305, nov. 2011.

CRAMER, S. W.; CHEN, C. C. Photodynamic Therapy for the Treatment of Glioblastoma. **Frontiers in Surgery**, v. 6, 21 jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fsurg.2019.00081>. Acesso em: 2 abr. 2025.

CUI, T.; WU, Y.; NI, C.; SUN, Y.; CHENG, J. Rheology and texture analysis of gelatin/dialdehyde starch hydrogel carriers for curcumin controlled release. **Carbohydrate Polymers**, v. 283, p. 119154, maio 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.119154>. Acesso em: 2 abr. 2025.

DOBRA SZCZYK, B. J.; MORGENSTERN, M. P. Rheology and the breadmaking process. **Journal of Cereal Science**, v. 38, n. 3, p. 229–245, nov. 2003. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210\(03\)00059-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0733-5210(03)00059-6). Acesso em: 2 abr. 2025.

EATON, D. F. Reference materials for fluorescence measurement. **Pure and Applied Chemistry**, v. 60, n. 7, p. 1107–1114, 1 jan. 1988.

EVANGELISTA, R. P. **Desenvolvimento e caracterização de nanopartículas poliméricas contendo associação de Fenil-tio-ftalocianinica de Zinco e Anfotericina B para aplicação em Terapia Fotodinâmica Antimicrobiana**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2019.

EVANS, L. Separation and quantitation of components in FD&C Red No. 3 using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 991, n. 2, p. 275–280, abr. 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0021-9673\(03\)00244-9](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(03)00244-9). Acesso em: 2 abr. 2025.

FDA. **FD&C Red No. 3**. Disponível em: <https://www.fda.gov/industry/color-additives/fdc-red-no-3>. Acesso em: 2 abr. 2025.

FERNANDES, A. S.; SOUZA FERREIRA, S. B. DE; BRUSCHI, M. L. Design as strategy for evaluation of the mechanical properties of binary mixtures composed of poly(methyl vinyl ether-alt-maleic anhydride) and Pluronic F127 for biomedical applications. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, v. 138, p. 105608, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2022.105608>. Acesso em: 2 abr. 2025.

FERNANDES, C. P. *et al.* Development of an insecticidal nanoemulsion with *Manilkara subsericea* (Sapotaceae) extract. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1186/1477-3155-12-22>. Acesso em: 2 abr. 2025.

FILIPPO, L. D. *et al.* Drug Delivery Nanosystems in Glioblastoma Multiforme Treatment: Current State of the Art. **Current Neuropharmacology**, v. 19, n. 6, p. 787–812, 27 maio 2021. DOI: <https://doi.org/10.2174/1570159X18666200831160627>. Acesso em: 2 abr. 2025.

FOREMAN-ORTIZ, I. U. *et al.* Nanoparticle tracking analysis and statistical mixture distribution analysis to quantify nanoparticle–vesicle binding. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 615, p. 50–58, jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.01.141>. Acesso em: 2 abr. 2025.

FRIBERG, S.; JANSSON, P. O.; CEDERBERG, E. Surfactant association structure and emulsion stability. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 55, n. 3, p. 614–623, 1976.

GANGULY, R. *et al.* Structural, rheological and therapeutic properties of pluronic F127 hydrogel and beeswax based lavender oil ointment formulations. **Journal of Molecular Liquids**, v. 365, p. 120157, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.120157>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GARAPATI, C. *et al.* Development and characterization of erythrosine nanoparticles with potential for treating sinusitis using photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 12, n. 1, p. 9–18, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2015.01.005>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GARG, A. D. *et al.* In Vitro Studies on Erythrosine-Based Photodynamic Therapy of Malignant and Pre-Malignant Oral Epithelial Cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34475, 2 abr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0034475>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GMBH, L. **STEP - Technology**. Disponível em: <https://www.lum-gmbh.com/technologies.html#step>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GONÇALVES, M. L. L. *et al.* Erythrosine as a photosensitizer for antimicrobial photodynamic therapy with blue light-emitting diodes – An in vitro study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 35, p. 102445, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102445>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GRAPENTIN, C.; BARNERT, S.; SCHUBERT, R. Monitoring the stability of perfluorocarbon nanoemulsions by Cryo-TEM image analysis and dynamic light scattering. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130674>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GRIFFIN, W. C. Classification of surface-active agents of “HLB”. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, p. 311–326, 1949.

GROENEVELD, I. *et al.* Parameters that affect the photodegradation of dyes and pigments in solution and on substrate – An overview. **Dyes and Pigments**, v. 210, p. 110999, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dyepig.2022.110999>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GUTIÉRREZ, J. M. *et al.* Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 13, n. 4, p. 245–251, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2008.01.005>. Acesso em: 2 abr. 2025.

GUTIÉRREZ, M. I.; GARCÍA, N. A. Dark and photoinduced interactions between xanthene dyes and quinones. **Dyes and Pigments**, v. 38, n. 4, p. 195–209, jul. 1998. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0143-7208\(97\)00080-6](https://doi.org/10.1016/S0143-7208(97)00080-6). Acesso em: 2 abr. 2025.

HO, T. M.; ABIK, F.; MIKKONEN, K. S. An overview of nanoemulsion characterization *via* atomic force microscopy. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n. 18, p. 4908–4928, 29 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1879727>. Acesso em: 2 abr. 2025.

HSIEH, B.-C. *et al.* Development of erythrosine-based photodynamic therapy with a targeted drug delivery system to induce HepG2 cell apoptosis in vitro. **Biochemical Engineering Journal**, v. 177, p. 108267, jan. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bej.2021.108267>. Acesso em: 2 abr. 2025.

HUANG, B. *et al.* Current Immunotherapies for Glioblastoma Multiforme. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 9 mar. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.603911>. Acesso em: 2 abr. 2025.

IBANESCU, C. *et al.* Stability of disperse systems estimated using rheological oscillatory shear tests. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 55, p. 933–940, 2010.

IBRAYEV, N. *et al.* The effect of heavy atoms on the deactivation of electronic excited states of dye molecules near the surface of metal nanoparticles. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 26, n. 40, p. 25986–25993, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1039/D4CP02621G>. Acesso em: 2 abr. 2025.

İLBASMIŞ TAMER, S. *et al.* Timolol Maleate In Situ Ophthalmic Mucoadhesive-Thermosensitive Gel: Development and Characterization. **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 21, n. 4, p. 348-354, 2023. DOI: <https://doi.org/10.4274/tjps.galenos.2023.50723>. Acesso em: 2 abr. 2024.

IZQUIERDO, P. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p. 26–30, 2002. DOI: <https://doi.org/10.1021/la010808c>. Acesso em: 2 abr. 2024.

IZQUIERDO, P. *et al.* The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 388–394, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2004.10.047>. Acesso em: 2 abr. 2025.

JAFARI, S. M.; MCCLEMENTS, D. J. **Nanoemulsions: Formulation, Applications, and Characterization**. Academic Press, 2018.

JESUS, F. L. M. *et al.* Preparation of a Nanoemulsion with *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) Oil by a Low-Energy/Solvent-Free Method and Evaluation of Its Preliminary Residual Larvicidal Activity. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/6756793>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KANPITTAYA, K. *et al.* Inhibitory Effects of Erythrosine/Curcumin Derivatives/Nano-Titanium Dioxide-Mediated Photodynamic Therapy on *Candida albicans*. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 2405, 21 abr. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules26092405>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KESTENS, V. *et al.* Validation of a particle tracking analysis method for the size determination of nano- and microparticles. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 19, n. 8, p. 271, 4 ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11051-017-3966-8>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KHIZAR, S. *et al.* Nanocarriers based novel and effective drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 632, p. 122570, fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2022.122570>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KIELBIK, A. *et al.* Effects of Photosensitization of Curcumin in Human Glioblastoma Multiforme Cells. **In Vivo**, v. 33, n. 6, p. 1857–1864, 29 out. 2019. DOI: <https://doi.org/10.21873/invivo.11679>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KLANG, V. *et al.* Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. **Micron**, v. 43, n. 2–3, p. 85–103, fev. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micron.2011.07.014>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 122–128, 2015a. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.09.003>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KOMAIKO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Food-grade nanoemulsion filled hydrogels formed by spontaneous emulsification and gelation: Optical properties, rheology, and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 46, p. 67–75, 2015b. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.031>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KUMAR, N.; MANDAL, A. Surfactant Stabilized Oil-in-Water Nanoemulsion: Stability, Interfacial Tension, and Rheology Study for Enhanced Oil Recovery Application. **Energy & Fuels**, v. 32, n. 6, p. 6452–6466, 21 jun. 2018. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/acs.energyfuels.8b00043>. Acesso em: 2 abr. 2025.

KUNIEDA, H.; MIYAJIMA, A. The effect of the mixing of oils on the hydrophile-lipophile-balanced (HLB) temperature in a water/nonionic surfactant/oil system. **Journal of Colloid And Interface Science**, v. 128, n. 2, p. 605–607, 1989. DOI: [https://doi.org/10.1016/0021-9797\(89\)90374-3](https://doi.org/10.1016/0021-9797(89)90374-3). Acesso em: 2 abr. 2025.

KUNTSCHKE, J.; HORST, J. C.; BUNJES, H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 417, n. 1–2, p. 120–137, set. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.02.001>. Acesso em: 2 abr. 2025.

LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. 3. ed. Springer, 2010.

LERCHE, D.; SOBISCH, T. Direct and Accelerated Characterization of Formulation Stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, n. 12, p. 1799–1811, dez. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/01932691.2011.616365>. Acesso em: 2 abr. 2025.

LIBRETEXTS. **Infrared Spectroscopy Absorption Table**. Disponível em: https://www.chem.libretexts.org/Ancillary_Materials/Reference/Reference_Tables/Spectroscopic_Reference_Tables/Infrared_Spectroscopy_Absorption_Table. Acesso em: 9 jan. 2025.

LIU, D. *et al.* Nanotechnology meets glioblastoma multiforme: Emerging therapeutic strategies. **WIREs Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, 12 jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1002/wnan.1838>. Acesso em: 2 abr. 2025.

LIU, G. *et al.* A Review on Drug Delivery System for Tumor Therapy. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, 4 out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.735446>. Acesso em: 2 abr. 2025.

LUO, J.; ZHANG, H.; CHEN, Q. Near-Infrared Light-Mediated Antibacterial Photodynamic Therapy Based on Erythrosine-Functionalized Mesoporous Silica-Coated Upconversion Nanoplatfrom. **ACS Omega**, v. 9, n. 32, p. 34799–34807, 13 ago. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1021/acsomega.4c04310>. Acesso em: 2 abr. 2025.

LUO, Z. **A Practical Guide to Transmission Electron Microscopy: Fundamentals**. 1. ed. Nova Iorque: Momentum Press, 2016.

MA, Q.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Nanoemulsions of thymol and eugenol co-emulsified by lauric arginate and lecithin. **Food Chemistry**, v. 206, p. 167–173, set. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.065>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MAHDI, E. S. *et al.* Formulation and in vitro release evaluation of newly synthesized palm kernel oil esters-based nanoemulsion delivery system for 30% ethanolic dried extract derived from local *Phyllanthus urinaria* for skin antiaging. **International journal of nanomedicine**, v. 6, n. May 2014, p. 2499–2512, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2147/ijn.s22337>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MAMARDASHVILI, G. M. *et al.* Photophysical properties of hybrid porphyrin-erythrosine B fluorophore in aqueous media and PVA films. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 28, n. 09n10, p. 665–674, 12 out. 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1142/S1088424624500421>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MAPRIC. **Crodamol GTCC - Trigl. Ac. Cáprico Caprílico**. Disponível em: <https://www.ict.unesp.br/Home/sobreoict/departamentosdeensino/odontologiarestauradora/lipq-laboratoriointegradodepesquisa/crodamol-gtcc.pdf>. Acesso em: 29 fev. 2024.

MARENA, G. D. *et al.* Development and characterization of an amphotericin B - loaded nanoemulsion applied to *Candida auris* biofilms control. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 74, p. 103566, ago. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2022.103566>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MELLO, D. F. *et al.* Caveats to the use of MTT, neutral red, Hoechst and Resazurin to measure silver nanoparticle cytotoxicity. **Chemico-Biological Interactions**, v. 315, p. 108868, jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2019.108868>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MICHELS, L. R. *et al.* Nasal administration of a temozolomide-loaded thermoresponsive nanoemulsion reduces tumor growth in a preclinical glioblastoma model. **Journal of Controlled Release**, v. 355, p. 343–357, mar. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2023.01.070>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MINAMI, T. *et al.* Fluorescence lifetime measurements under a microscope by the time-correlated single-photon counting technique. **Journal of Luminescence**, v. 35, n. 5, p. 247–253, ago. 1986.

MOGHASSEMI, S. *et al.* Nanoemulsion applications in photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 351, p. 164–173, nov. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2022.09.035>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MOONEY, J. *et al.* Current Approaches and Challenges in the Molecular Therapeutic Targeting of Glioblastoma. **World Neurosurgery**, v. 129, p. 90–100, set. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2019.05.205>. Acesso em: 2 abr. 2025.

MUSAZZI, U. M. *et al.* Emulsion versus nanoemulsion: how much is the formulative shift critical for a cosmetic product? **Drug Delivery and Translational Research**, v. 8, n. 2, p. 414–421, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13346-017-0390-7>. Acesso em: 2 abr. 2025.

NAWARA, K.; WALUK, J. Improved Method of Fluorescence Quantum Yield Determination. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 17, p. 8650–8655, 5 set. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b02013>. Acesso em: 2 abr. 2025.

OLIVEROS, M. E. M. **Produção e Caracterização Analítico/Estrutural/Propriedades de Nanocompósitos Cu-MWCNT**. Tese (Doutorado em Engenharia de Materiais e de Processos Químicos e Metalúrgicos) – Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2012.

ORAFIDIYA, L. O.; OLADIMEJI, F. A. Determination of the required HLB values of some essential oils. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 237, n. 1–2, p. 241–249, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-5173\(02\)00051-0](https://doi.org/10.1016/s0378-5173(02)00051-0). Acesso em: 2 abr. 2025.

PAARAKH, M. P. *et al.* Release Kinetics – Concepts and Applications. **International Journal of Pharmacy Research & Technology**, v. 8, n. 1, 1 jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.31838/ijprt/08.01.02>. Acesso em: 2 abr. 2025.

PAUL, D. R. Elaborations on the Higuchi model for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 13–17, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2010.10.037>. Acesso em: 2 abr. 2025.

PEPPER, N. B.; STUMMER, W.; EICH, H. T. The use of radiosensitizing agents in the therapy of glioblastoma multiforme—a comprehensive review. **Strahlentherapie und Onkologie**, v. 198, n. 6, p. 507–526, 3 jun. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00066-022-01942-1>. Acesso em: 2 abr. 2025.

POULSEN, E. Case study: Erythrosine. **Food Additives and Contaminants**, v. 10, n. 3, p. 315–323, maio 1993. DOI: <https://doi.org/10.1080/02652039309374154>. Acesso em: 2 abr. 2025.

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

PUBCHEM. **Erythrosine B**. Disponível em: <https://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Erythrosine-B>. Acesso em:

QIAN, C.; MCCLEMENTS, D. J. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1000–1008, 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.09.017>. Acesso em: 2 abr. 2025.

QUÍMICA, D. **Especificação técnica do miristato de isopropila**. Disponível em: <http://chrome-extension://efaidnbmnnnibpcajpcgclefindmkaj/https://www.dipaquimica.com.br/admin/files/arquivos/207/miristato-de-isopropilaespec.pdf>. Acesso em: 29 fev. 2024.

RAMLI, H. *et al.* Basic principle and good practices of rheology for polymers for teachers and beginners. **Chemistry Teacher International**, v. 4, n. 4, p. 307–326, 30 dez. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1515/cti-2022-0010>. Acesso em: 2 abr. 2025.

RAO, J.; MCCLEMENTS, D. J. Stabilization of phase inversion temperature nanoemulsions by surfactant displacement. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 11, p. 7059–7066, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf100990r>. Acesso em: 2 abr. 2025.

REBOUÇAS, L. *et al.* Linseed Oil Nanoemulsion with Pluronic® F127 Loaded with Betulinic Acid: Preparation, Rheology, MTT Assay and in vitro Release Kinetics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2022. DOI: <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20220063>. Acesso em: 2 abr. 2025.

REZENDE, N. *et al.* Standardization of a resazurin-based assay for the evaluation of metabolic activity in oral squamous carcinoma and glioblastoma cells. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p. 371–374, jun. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2019.05.004>. Acesso em: 2 abr. 2025.

RIQUELME, N. *et al.* Effect of Gelling Agent Type on the Physical Properties of Nanoemulsion-Based Gels. **Colloids and Interfaces**, v. 7, n. 3, p. 49, 4 jul. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/colloids7030049>. Acesso em: 2 abr. 2025.

ROLIM, J. P. M. L. *et al.* The antimicrobial activity of photodynamic therapy against *Streptococcus mutans* using different photosensitizers. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 106, p. 40–46, jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2011.10.001>. Acesso em: 3 abr. 2025.

RUSSO, E.; VILLA, C. Poloxamer Hydrogels for Biomedical Applications. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 12, p. 671, 10 dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11120671>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SAHU, T. *et al.* Nanotechnology based drug delivery system: Current strategies and emerging therapeutic potential for medical science. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 63, p. 102487, jun. 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2021.102487>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SCHRAMM, G. **Reologia e reometria: fundamentos teóricos e práticos**. 2. ed. Artliber, 2006.

SHI, F.-F. *et al.* Preparation of oral nanoemulsion drug delivery system loaded with punicalagin: in vitro antibacterial activity, drug release, and cell safety studies. **Macromolecular Research**, v. 32, n. 3, p. 243–252, 13 mar. 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s13233-023-00224-8>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SHI, S.-C. *et al.* The Synergic Effect of Erythrosine and Gold Nanoparticles in Photodynamic Inactivation. **Sustainability**, v. 15, n. 4, p. 3621, 16 fev. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/su15043621>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SIEPMANN, J.; PEPPAS, N. A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 418, n. 1, p. 6–12, out. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.03.051>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SILVA, C. N. *et al.* Analysis of the Epidemiological Profile of Glioblastomas in Brazil Between 2012 and 2021: evidence and challenges for public health. **JBNC – Jornal Brasileiro de Neurocirurgia**, v. 35, n. 1, p. 66–74, 2024. DOI: <https://doi.org/10.22290/jbnc.2024.350108>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SINGH, T. R. R.; LAVERTY, G.; DONNELLY, R. **Hydrogels: design, synthesis and applications in drug delivery and regenerative medicine**. CRC Press, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1201/9781315152226>.

SNIGUR, D. *et al.* Spectroscopic and computational studies of erythrosine food dye protonation in aqueous solution. **Dyes and Pigments**, v. 198, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2021.110028>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SO, P. T.; DONG, C. Y. Fluorescence Spectrophotometry. **Encyclopedia of Life Sciences**, 2001. DOI: <https://doi.org/10.1038/npg.els.0002978>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SOLANS, C. *et al.* Nano-emulsions. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 10, n. 3–4, p. 102–110, 2005. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2005.06.004>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SOLANS, C.; SOLÉ, I. Nano-emulsions: Formation by low-energy methods. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 17, n. 5, p. 246–254, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2012.07.003>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SOLÉ, I. *et al.* Nano-emulsions preparation by low energy methods in an ionic surfactant system. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, n. 1–3, p. 138–143, 2006. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2006.02.013>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SOLÉ, I. *et al.* Study of nano-emulsion formation by dilution of microemulsions. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 376, n. 1, p. 133–139, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2012.02.063>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SOUSA, R. M. G. *et al.* Development and in vitro cytotoxicity assessment of nanoemulsified lawsone. **Chemical Papers**, v. 76, n. 8, p. 5043–5050, 4 ago. 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11696-022-02242-9>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SOUZA FERREIRA, S. B. *et al.* Development, in vitro and ex vivo evaluation of bioadhesive colloidal systems for curcumin skin delivery aiming the antioxidant and photoprotective activities. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 91, 2024. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105195>. Acesso em: 3 abr. 2025.

SPECIALCHEM. **Glycine Soja Oil**. Disponível em: <https://cosmetics.specialchem.com/inci-ingredients/glycine-soja-oil>. Acesso em: 29 fev. 2024.

TADROS, T. *et al.* Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cis.2003.10.023>. Acesso em: 3 abr. 2025.

VACCARI, C. B. **Estudos fotofísicos e fotobiológicos da ftalocianina NzPc e de nanotubos de carbono aplicáveis a processos fotodinâmicos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

VASILEV, A. *et al.* Using Light for Therapy of Glioblastoma Multiforme (GBM). **Brain Sciences**, v. 10, n. 2, p. 75, 31 jan. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/brainsci10020075>. Acesso em: 3 abr. 2025.

VÁZQUEZ-ORTEGA, F.; LAGUNES, I.; TRIGOS, Á. Cosmetic dyes as potential photosensitizers of singlet oxygen generation. **Dyes and Pigments**, v. 176, 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2020.108248>. Acesso em: 3 abr. 2025.

WALKER, J. G. Improved nano-particle tracking analysis. **Measurement Science and Technology**, v. 23, n. 6, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.1088/0957-0233/23/6/065605>. Acesso em: 3 abr. 2025.

WOOD, S. *et al.* Erythrosine is a potential photosensitizer for the photodynamic therapy of oral plaque biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 57, n. 4, p. 680–684, 1 abr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dkl021>. Acesso em: 3 abr. 2025.

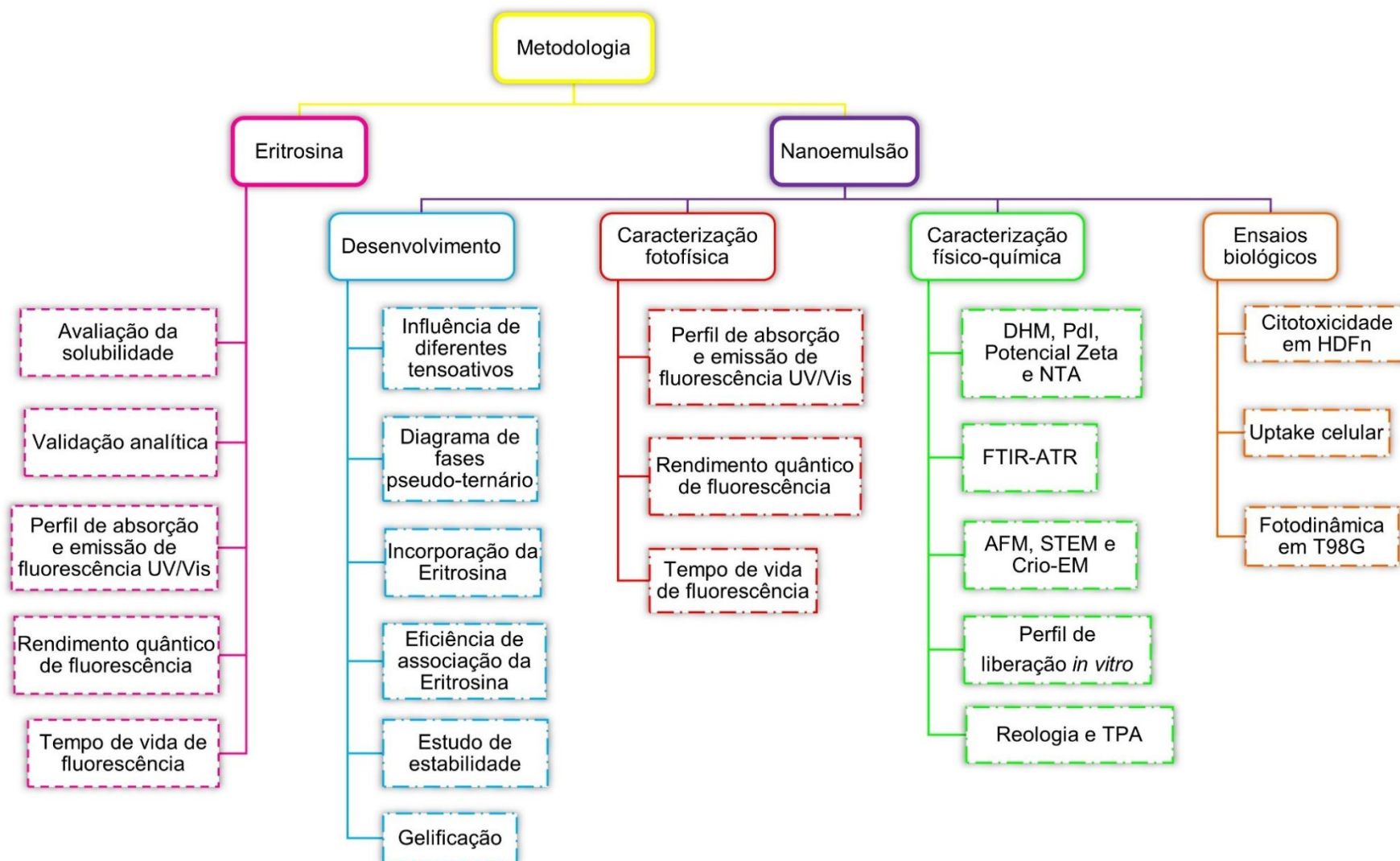
WU, W. *et al.* Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance. **Pharmacological Research**, v. 171, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2021.105780>. Acesso em: 3 abr. 2025.

YIN, L. J. *et al.* Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β -carotene nanodispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 6, p. 1617–1622, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2008.12.005>. Acesso: 3 abr. 2025.

ZHANG, L. *et al.* In vitro and in vivo Research of Sustained Release ketotifen fumarate for Treatment of asthma. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 24, n. 5, 2022. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s11051-022-05475-7>. Acesso em: 3 abr. 2025.

ZHANG, X.-F.; ZHANG, J.; LIU, L. Fluorescence Properties of Twenty Fluorescein Derivatives: Lifetime, Quantum Yield, Absorption and Emission Spectra. **Journal of Fluorescence**, v. 24, n. 3, p. 819–826, 11 maio 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s10895-014-1356-5>. Acesso em: 3 abr. 2025.

APÊNDICE A - FLUXOGRAMA DAS ETAPAS DA METODOLOGIA E ESTRATÉGIA INVESTIGATIVA



Fonte: Própria autora.