



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



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

Camila Fernanda Amantino

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco

Araraquara – SP

2019



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



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

Camila Fernanda Amantino

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

Orientador: Prof. Dr. Fernando Lucas Primo

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Claudio Tedesco

Araraquara- SP

2019

Ficha Catalográfica

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

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

CAPES: 33004030078P6

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOPROCESSOS	18
2.2. ANTRAQUINONAS	20
2.3. NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS NANOCARREADORES	24
2.3.1. NANOEMULSÕES	26
2.3.2. NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	28
3. OBJETIVOS	30
3.1. OBJETIVO GERAL	30
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1. MATERIAIS	30
4.2. PROTOCOLO DE PREPARO DE NANOEMULSÃO CONTENDO CORANTE VERMELHO	31
4.3. PROTOCOLO DE PREPARO DA NANOCÁPSULA POLIMÉRICA CONTENDO CORANTE VERMELHO E FTALOCIANINA DE CLORO ALUMÍNIO (CIAI _{Pc})	32
4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E NANOCAPSULAS	33
4.4.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	33
4.4.2. CARACTERIZAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES COM USO DO LUMISIZER	33
4.5. ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS.	35
4.6. LINEARIDADE DO CORANTE VERMELHO: MÉTODO ESPECTROANALÍTICO	35
4.6.1. QUANTIFICAÇÃO DE CV E CIAI _{Pc} EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS	36
4.7. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO CV E CIAI _{Pc} NAS NC	36
4.8. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA	37
4.9. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL ATRAVÉS DO TESTE DE MTT	37
4.10. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR USANDO METODO DA RESAZURINA	39
5. RESULTADO E DISCUSSÕES	41
5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS	41
5.1.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA	41
5.1.2. CARACTERIZAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES COM USO DO LUMISIZER	46

5.1.3.	ESTUDOS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)	51
5.2.	ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS PARA OS ATIVOS LIVRES E NANOENCAPSULADOS	58
5.4.	DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DO CV E CIAIPCc NAS NC	63
5.5.	DERTERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA	63
5.6.	ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE EM CULTURA CELULAR DE LINHAGEM DE FIBROBLASTOS DE MURINO	67
6.	CONCLUSÕES	71
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	73

RESUMO

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

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

ABSTRACT

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

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

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - DIAGRAMA DE JABLONSKI SIMPLIFICADO, ILUSTRANDO AS TRANSIÇÕES ELETRÔNICAS QUE DÃO ORIGEM AOS MECANISMOS DA TFD E FOTOPROCESSOS. Φ_F : RENDIMENTO QUÂNTICO DE FLUORESCÊNCIA; Φ_T : RENDIMENTO QUÂNTICO DE TRIPLETO; Φ_{ISC} : RENDIMENTO QUÂNTICO DE CRUZAMENTO INTER-SISTEMAS; Φ_{IC} : RENDIMENTO QUÂNTICO DE CONVERSÃO INTERNA; Φ_{Δ} : RENDIMENTO QUÂNTICO DE OXIGÊNIO SINGLET; S_0 : ESTADO SINGLET FUNDAMENTAL; S_1 : ESTADO SINGLET EXCITADO.....	20
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DAS ANTRAQUINONAS	21
FIGURA 3 – PERFIL DE LIBERAÇÃO DOS FÁRMACOS: CONVENCIONAL X CONTROLADA (■ LIBERAÇÃO SUSTENTADA, ■ TERAPIA CONVENCIONAL)	25
FIGURA 4 PRINCIPAIS MATERIAIS NANOESTRUTURADOS POLIMÉRICOS UTILIZADOS PARA APLICAÇÃO BIOLÓGICA.	26
FIGURA 5 - ESQUEMA ILUSTRATIVO DA NANOEMULSÃO DO TIPO ÓLEO EM ÁGUA.....	27
FIGURA 6 - ESQUEMA DE NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS: (A) FÁRMACO DISSOLVIDO NO NÚCLEO OLEOSO DAS NANOCÁPSULAS; B) FÁRMACO ADSORVIDO À PAREDE POLIMÉRICA DAS NANOCÁPSULAS.	28
FIGURA 7 ESQUEMA DE PREPARO NANOEMULSÕES.....	32
FIGURA 8 ESQUEMA DE PREPARO DAS NANOCÁPSULAS.....	33
FIGURA - 9 REPRESENTAÇÃO DO EQUIPAMENTO LUMISIZER UTILIZADO PARA NAS MEDIDAS DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS NANOCÁPSULAS. FONTE: DKSH TECHNOLOGY PTE LTD - COPYRIGHT © 2016.	34
FIGURA 10 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA VAZIA/NC.	43
FIGURA 11 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA CV/NC.....	44
FIGURA 12 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA CV_CLALPC/NC.	44
FIGURA 13 ESTUDO DE ESTABILIDADE MONITORANDO-SE O TAMANHO DE PARTÍCULAS, PDI E POTENCIAL ZETA EM FUNÇÃO DO TEMPO PARA CLALPC/NC.....	45
FIGURA 14 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA VAZIA/NC, CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABSCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	47
FIGURA 15 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA CV/NC, CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABSCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	47
FIGURA 16 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA CV_CLALPC/NC, CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H.. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABSCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	48
FIGURA 17 EVOLUÇÃO DOS PERFIS DE TRANSMISSÃO DA CV_CLALPC/NC CENTRIFUGADAS A 2616 XG POR 4,5 H. PRIMEIRO REGISTRO INFERIOR, ÚLTIMO PERFIL SUPERIOR DIREITO. A ABSCISSA MOSTRA A POSIÇÃO (NM) E A ORDENADA A TRANSMISSÃO DE LUZ.....	48

FIGURE 18 INTEGRAL DA TRANSMISSÃO NA DEPENDÊNCIA DE TEMPO (S) PARA DIFERENTES AMOSTRAS DE NANOCÁPSULAS USANDO LUMISIZER A 2616 XG POR 4,5 H. A T = 25 °C	49
FIGURA 19 - FOTOMICROGRAFIAS TRIDIMENSIONAL E BIDIMENSIONAL OBTIDAS DAS FORMULAÇÕES CV/NC (A) E CV_CLALPC/NC (B) POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA.....	52
FIGURE 20 - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E PERFIL TOPOGRÁFICO DADA PELA ANÁLISE DO SOFTWARE MOSTRANDO MEDIÇÕES DO DIÂMETRO E ALTURA DAS CV/NC.	53
FIGURA 21 - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E PERFIL TOPOGRÁFICO DADA PELA ANÁLISE DO SOFTWARE MOSTRANDO MEDIÇÕES DO DIÂMETRO E ALTURA DAS CV_CLALPC/NC.	54
FIGURA 22 - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E HISTOGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS PARA CV/NC.	55
FIGURA 23 - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL E HISTOGRAMA MOSTRANDO A DISTRIBUIÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA EM FUNÇÃO DO NÚMERO DE AMOSTRAS PARA CV_CLALPC/NC.	55
FIGURA 24 - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL DAS ANÁLISES DE DIFERENÇA DE FASE DA CV/NC.....	56
FIGURA 25 - FOTOMICROGRAFIA BIDIMENSIONAL DAS ANÁLISES DE DIFERENÇA DE FASE DA CV_CLALPC/NC.	57
FIGURA 26 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO (A) E ABSORÇÃO NORMALIZADA (B) NO UV/VIS DO CV/DMSO E CV/NC, COM MÁXIMOS DE ABSORÇÃO EM 430 NM E 505 NM PARA CV/ DMSO E 428 E 503 NM PARA CV/NC/DMSO.	58
FIGURA 27 - ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA (A) E EMISSÃO NORMALIZADA (B) NO UV-VIS DO CV/DMSO E DO CV/NC NA CONCENTRAÇÃO DE 0,1 MG/ML, COM COMPRIMENTO DE EXCITAÇÃO DE 480 NM PARA AMBOS, TEMPO DE INTEGRAÇÃO DE 0,5 S E FENDAS DE 3,0/3,0 NM PARA EXCITAÇÃO E EMISSÃO, RESPECTIVAMENTE.	59
FIGURA 28 - ESPECTRO DE ABSORÇÃO NORMALIZADA NO UV/VIS PARA O (A) CV, CLALPC E CV+CLALPC EM DMSO E (B) CV/NC, CLALPC/NC, CV_CLALPC/NC E CV_CLALPC/NC + CV EM DMSO.	60
FIGURA 29 - ESPECTRO DE EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NORMALIZADA NO UV-VIS (A) CV/DMSO COM EXCITAÇÃO EM 480NM, CLALPC/DMSO COM EXCITAÇÃO EM 615 NM E CV/CLALPC COM EXCITAÇÕES EM 480 NM E 615NM (B) CV/NC EM DMSO COM EXCITAÇÃO EM 480 NM, CLALPC/NC EM DMSO COM EXCITAÇÃO EM 615 NM CV_CLALPC/NC EM DMSO, COM COMPRIMENTOS DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 480 NM E 615 NM, TEMPO DE INTEGRAÇÃO DE 0,5 S E FENDAS DE 3,0/3,0 NM PARA EXCITAÇÃO E EMISSÃO, RESPECTIVAMENTE.	61
FIGURA 30 - CONJUNTOS DE ESPECTROS DE ABSORÇÃO UV- VIS EM SOLUÇÃO DMSO EM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES (1,0 A 20 MG/ML). CURVA DE CORRELAÇÃO ENTRE A ABSORÇÃO MÁXIMA EM FUNÇÃO DA CONCENTRAÇÃO DE CORANTE NA FAIXA DE 1,0 A 20 MG/ML. $Y = 0,0061X + 0,0064$ $R^2 = 0,9991$, $N = 3$	62
FIGURA 31 - DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA DO CV/NC E CV/DMSO_ACN, COM COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO FIXADO EM 470 NM.....	64
FIGURA 32 - DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA PARA CLALPC/DMSO E CLALPC/NC, COM COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO FIXADO EM 540 NM.	64
FIGURA 33 DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA DO CV_CLALPC/ NC, COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 640 NM.....	65
FIGURA 34 - DECAIMENTO DE FLUORESCÊNCIA DO CV_CLALPC/NC, COMPRIMENTO DE ONDA DE EXCITAÇÃO DE 470 NM.....	65

- FIGURA 35** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV LIVRE EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO MTT, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 2,5 µG/ML, B = 5,0 µG/ML, C = 15 µG/ML, D = 25 µG/ML E E = 50 µG/ML. A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05).67
- FIGURA 36** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO MTT, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 5,0 µG/ML, B = 15 µG/ML, C = 25 µG/ML E D = 50 µG/ML. A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05).68
- FIGURA 37** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO REZASURINA, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 5,0 µG/ML, B = 15 µG/ML, C= 25 µG/ML E D =50 µG/ML. A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05).69
- FIGURA 38** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINO USANDO MTT, ONDE CT= CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 2,5 µG/ML E 12 µG/ML (2,5%), B = 5,0 µG/ML E 25 µG/ML (5%), C = 15 µG/ML E 25 µG/ML (15%), D = 25 µG/ML E 75 µG/ML (25%) E = 50 µG/ML E 250 µG/ML (50%). A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05).70
- FIGURA 39** - ENSAIO IN VITRO DE CITOTOXIDADE DO CV/NC EM LINHAGEM NIH/3T3 FIBROBLASTOS DE MURINHO USANDO REZASURINA, ONDE CT = CONTROLE SOMENTE COM DMEM, A = 5,0 µG/ML E 25 µG/ML (5%), B = 15 µG/ML E 25 µG/ML (15%), C= 25 µG/ML E 75 µG/ML (25%) E D = 50 µG/ML E 250 µG/ML (50%) E = 50% DE VAZIA/NC. A SIGNIFICÂNCIA ESTATÍSTICA FOI DETERMINADA PELO TESTE DE ANÁLISE DE VARIÂNCIA ONE-WAY ANOVA SEGUIDO DO PÓS-TESTE TUKEY T-TEST PARA MÚLTIPLAS COMPARAÇÕES (*P<0,05).71

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 ANTRAQUINONAS COMERCIALIZADAS.....	22
TABELA 2 - DADOS DE TAMANHO DE PARTÍCULA, ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE E POTENCIAL ZETA DAS NANOEMULSÕES CONTENDO DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE CV	42
TABELA 3 - PARÂMETROS ANALISADOS DA NANOEMULSÃO COM CV A 0,1MG/ML NO 1ºDIA E APÓS 7 DIAS	42
TABELA 4 - DADOS DE TAMANHO DE PARTÍCULA, PDI E POTENCIAL ZETA DAS NANOCÁPSULAS EM FUNÇÃO DO TEMPO.....	45
TABELA 5 - TAXA DE SEPARAÇÃO REPRESENTADA PELA INCLINAÇÃO E CALCULADA PELO SOFTWARE SEPVIEW 5.1, DEPOIS DE INTEGRAR OS ARQUIVOS DE TRANSMISSÃO.	50
TABELA 6 - RESULTADO DOS TEMPOS DE VIDA DE PRATELEIRA (SHELF-LIFE) DE CADA AMOSTRA	50
TABELA 7 - TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA (τ) PARA AS AMOSTRAS ESTUDADAS NOS DIFERENTES AMBIENTES QUÍMICOS.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS

ϕ_{Δ} Rendimento quântico de oxigênio singlete

τ_f Tempo de vida de fluorescência

ϕ_F Rendimento quântico de fluorescência

ACN Acetonitrila

AFM do inglês *Atomic Force Microscopy* (microscopia de força atômica)

CIAIPc Ftalocina de Cloro e Alumínio

CIAIPc/NC Nanocápsula com ftalocianina de cloro e alumínio

CV Corante vermelho

CV/NC Nanocápsula com corante vermelho

CV_CIAIPc/NC Nanocápsula com corante vermelho e ftalocianina de cloro e alumínio

d Tamanho médio de partícula

DMSO Dimetil Sulfóxido

EPM Erro padrão médio

EROS Espécies reativas de oxigênio

FBS do inglês *Fetal bovine serum* (Soro fetal bovino)

FLIM do inglês *Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy* (Microscópio de fluorescência confocal com resolução do tempo)

FS Fotossensibilizador

LP Lipossoma

LPc Concentração de corante presente no sobrenadante da amostra.

MFA Microscopia de força atômica

MTT Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio

NC Nanocápsula

NE Nanoemulsão

nm Nanômetros

PCL Policaprolactona

PdI do inglês *polydispersity index* (Índice de polidispersão)

PGA Ácido poli-glicólico

PLA Ácido poli-lático

PLGA Poli-lático-co-glicólico

RCF do inglês *relative centrifugal force* (Força centrífuga relativa)

RD do inglês *Red Dye* (corante vermelho)

S⁰ Estado fundamental

S¹ Estado singleto excitado

T¹ Estado tripleto excitado

TCSPC do inglês *Time-Correlated Single Photon Counting*

TFD Terapia Fotodinâmica

TPc Concentração total de corante na formulação

TTTR do inglês *Time-Tagged Time-Resolved*

Vazia/NC Nanocápsula vazia

ξ Potencial Zeta

Agradecimentos

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

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

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

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

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

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP – Araraquara

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

1. INTRODUÇÃO

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

O mecanismo da TFD consiste basicamente na aplicação de uma molécula fotossensível chamada de fotossensibilizador, seguida de irradiação, em um comprimento de onda específico, com absorção de energia desencadeando uma série de reações fotoquímicas que levam a produção de radicais livres, destacando-se o oxigênio singleto ($^1\text{O}_2$) e espécies reativas de oxigênio (EROS) que levam a destruição do tecido alvo (LI et al., 2017a).

Os fotossensibilizadores são corantes (naturais ou sintéticos), capazes de absorverem luz em um comprimento de onda específico, desencadeando uma série de reações que resultam na produção de $^1\text{O}_2$ e EROS (KWIATKOWSKI et al., 2018). Neste contexto, destacam-se as antraquinonas, uma classe de corantes naturais que possuem a capacidade de absorverem luz, e de produzir essas espécies reativas de oxigênio (MONTROYA et al., 2005).

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

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

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

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

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

A nanotecnologia se consolidou como uma mudança revolucionária já de âmbito industrial, trazendo uma nova compreensão e perspectivas para o campo das ciências da vida,

mudando as formas de diagnósticos e tratamento de doenças, produção de alimentos e biomateriais com aplicação farmacêutica (HOLBAN, 2018).

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

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

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOPROCESSOS

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

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

2.1.1. MECANISMOS DA TFD E FOTOPROCESSOS

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

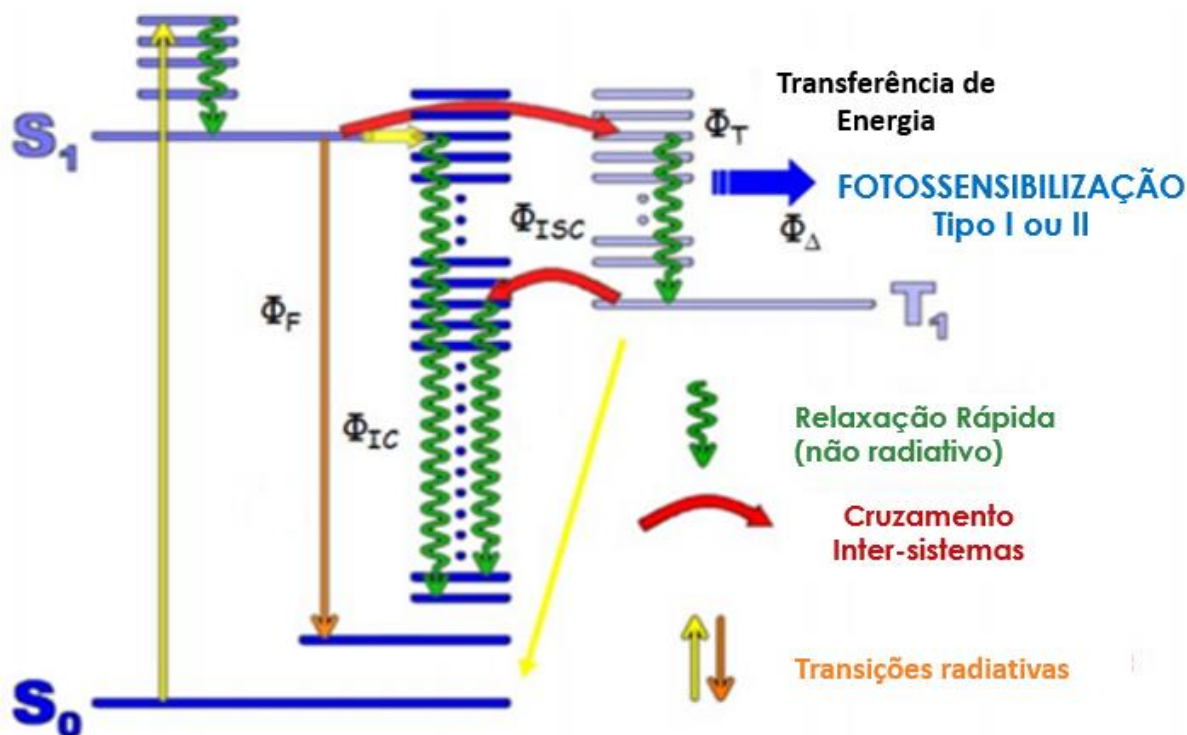
Após internalização celular do FS, inicia-se o processo de irradiação com laser em comprimento de onda na região onde o FS absorve maior energia, com isso o FS sai do seu estado fundamental (S^0) de menor energia e passa a popular os estados singletos ($S^1 - S^n$) de maior energia, então essa parte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

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

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

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

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

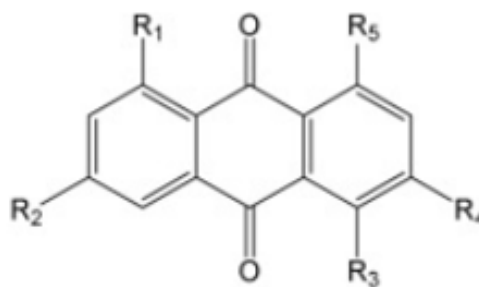


Fonte: adaptado PRIMO, 2009.

2.2. ANTRAQUINONAS

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

Figura 2 - Estrutura química das antraquinonas



Fonte: DUVAL et al., 2016.

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

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

Tabela 1 - Antraquinonas Comercializadas

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

Fonte: adaptado de MALIK e MÜLLER 2016

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

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

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

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

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

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

2.3. NANOTECNOLOGIA E SISTEMAS NANOCARREADORES

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

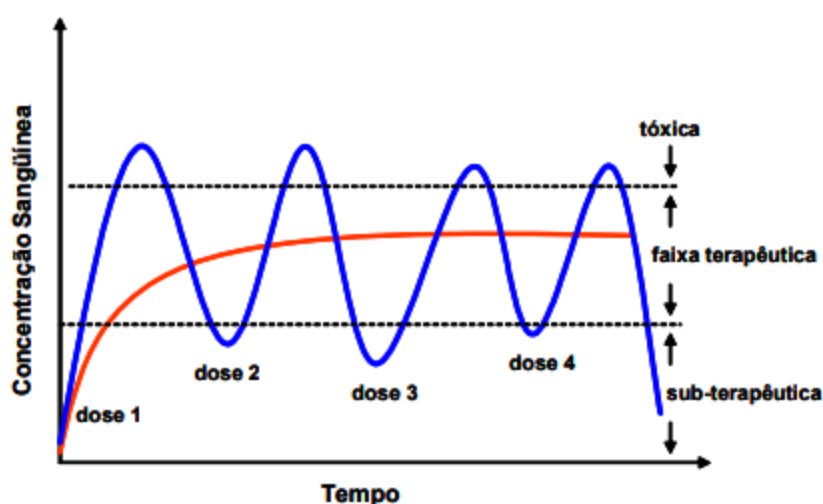
O emprego de sistemas nanoestruturados para incorporação de princípios ativos e fármacos proporciona certas vantagens, comparando-se aos sistemas de liberação convencionais, tendo como principais diferenças: a biocompatibilidade, o transporte eficiente do fármaco, a liberação controlada e redução de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

Nas formas de administração convencionais (aplicação intravenosa, oral, micropartículas, etc.) leva-se ao aumento da concentração plasmática do fármaco, até atingir um pico máximo, podendo ultrapassar os limites aceitáveis, atingindo-se níveis tóxicos e, posteriormente, resultando em um declínio repentino para concentrações inferiores à faixa terapêutica. Devido ao fato dos níveis plasmáticos do fármaco serem dependentes das doses

administradas, esse processo pode ser problemático se a concentração inicial estiver próxima a tóxica, ou próxima a faixa onde ela é ineficaz (PRIMO, 2009; KESHARWANI et al., 2018).

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

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



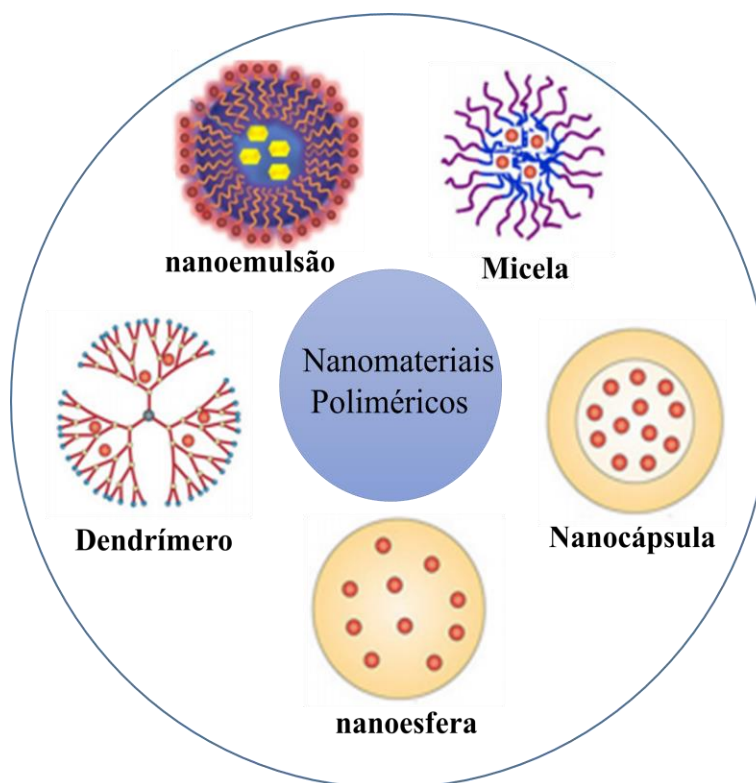
Fonte: Adaptado de PRIMO, 2009.

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

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

merecendo destaque as nanoesferas, nanocápsulas, nanoemulsão, micelas poliméricas e dendrímeros (TANG et al., 2016, VENDITTI et al., 2017).

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



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

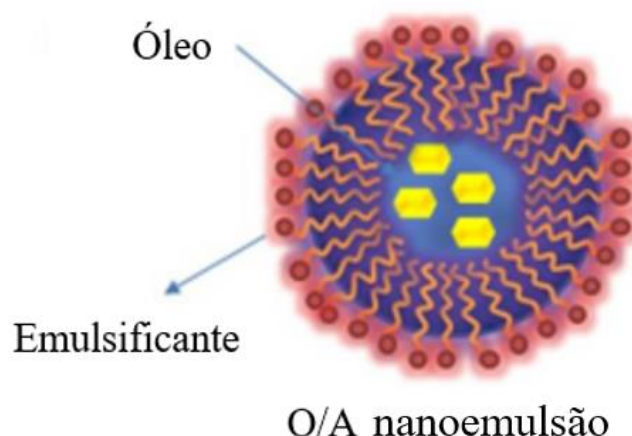
Dentre esses nanocarreadores poliméricos, destacamos as nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas, que serão melhor apresentadas nas seções seguintes.

2.3.1. NANOEMULSÕES

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

mecânicos como os homogeneizadores de alta pressão, ultrassônicos; ou também pelos métodos de baixa energia que utilizam componentes químicos para o fornecimento de energia para que o processo ocorra, como por exemplo os métodos por inversão de fase ou emulsificação sob ação de catalise (COSTA, et al., 2012; DONSI; FERRARI, 2016; KUMAR; MANDAL, 2018).

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



Fonte: Adaptada de KUMAR e DIVYA, 2015.

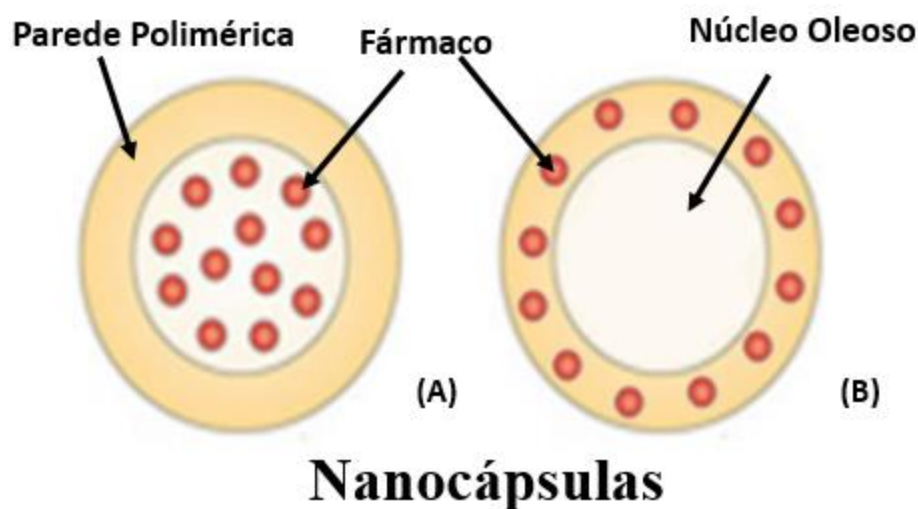
Estes sistemas coloidais são emulsificados em condições especiais e bem controladas de temperatura e pressão, sendo amplamente utilizados nas indústrias de alimentos, fármacos e, principalmente de cosméticos (McCLEMENTS, 2012). As NE do tipo óleo em água, possuem características vantajosas como proteção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

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

2.3.2. NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

As nanocápsulas poliméricas (NC) são constituídas por um núcleo que pode ser aquoso ou oleoso e uma membrana externa polimérica (parede polimérica) (Figura 6). (OLIVEIRA et al., 2017; CRUCHO; BARROS, 2017). As NC possuem diversas vantagens, por exemplo, os polímeros utilizados em seu preparo possuem menor custo que fosfolipídios presentes na composição dos lipossomas, além de a quantidade de polímeros ser menor em comparação com as nanoesferas (SIQUEIRA-MOURA et al., 2013). Além disso as NC possuem alta eficiência de encapsulamento, ou seja, maior capacidade de armazenamento de ativos, podendo estar localizado na superfície ou no núcleo das NC, além de possuírem maior estabilidade em temperatura ambiente, com isso as NC atribuem um maior tempo de armazenamento (tempo de prateleira) dos ativos (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010; CRUCHO; BARROS, 2017).

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



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

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

O método de deposição interfacial do polímero pré-formado é o mais simples dentre os três métodos, o qual é composto por uma fase orgânica, que é constituída de um solvente

ou uma mistura de solventes solúveis em água e de um polímero que pode ser de origem natural, semissintético ou sintético. (FESSI et al., 1989; DOS SANTOS et al., 2016).

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

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar formulações nanoestruturadas poliméricas contendo um corante biotecnológico derivado de antraquinona, e investigar o potencial de utilização desta formulação em Terapia Fotodinâmica (TFD), bem como fornecer subsídios para outras aplicações futuras como corante biotecnológico nanoestruturado.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as características fotofísicas do corante livre e nanoencapsulado;
- Desenvolver e caracterizar as formulações nanoestruturadas poliméricas contendo o corante;
- Determinar parâmetros físico-químicos da formulação utilizando-se espectroscopia de correlação de fótons (DLS);
- Determinar as características de interação do corante na formulação e sua estabilidade físico - química;
- Determinar as características morfológicas das formulações utilizando-se microscopia eletrônica de alta resolução;
- Avaliar o perfil de citotoxicidade e fotoatividade da formulação em cultura celular em monocamada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

Para preparo de todas as soluções e formulações, foi utilizada água ultrapura obtida do sistema *E-Pure Barnstead* (Millipore, Cotia, São Paulo). Para preparo das nanoemulsões foram utilizados os seguintes reagentes químicos: fosfatidilcolina de soja - Lipoid S 100® (Ludwigshafen, Alemanha), Pluronic F-68, óleo Edenor KS (Cosmoquímica, São Paulo, SP), para preparo das nanocápsulas foram utilizados: Pluronic F-68 e Kolliphor 188, óleo de soja (Sigma-Aldrich co. St. Louis, MO, EUA), fosfatidilcolina de soja - Lipoid S100® (Lipid, Ribeirão Preto, SP) e poli (ácido láctico-co-glicólico (PLGA) (Sigma-Aldrich). O CV derivado de antraquinona foi fornecido após a produção por processo fermentativo e purificado pelo grupo de pesquisa do Prof. Alberto Colli Badino, do Departamento de Engenharia Química da UFSCar, campus de São Carlos/SP, em colaboração com o Prof.

Álvaro de Baptista Neto, do Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – UNESP. Além deste ativo foi empregado também como princípio ativo o fotossensibilizador sintético ftalocianina de cloro alumínio - ClAlPc (Sigma Aldrich). Foram utilizados como solventes orgânicos: acetona, acetonitrila, dimetilsulfóxido, metanol, etanol, todos de grau analítico e sem tratamento prévio (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).

Para os ensaios de viabilidade celular foram utilizadas linhagens de células NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658™, meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM; Gibco BRL, EUA) suplementado com 2,0 mmol.L⁻¹ de glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 0,1 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 10% e soro fetal bovino (Cultlab, Campinas/Brasil), soro fetal bovino (SFB), tampão fosfato salino (PBS 1x, Sigma), tripsina (Gibco BRL, EUA).

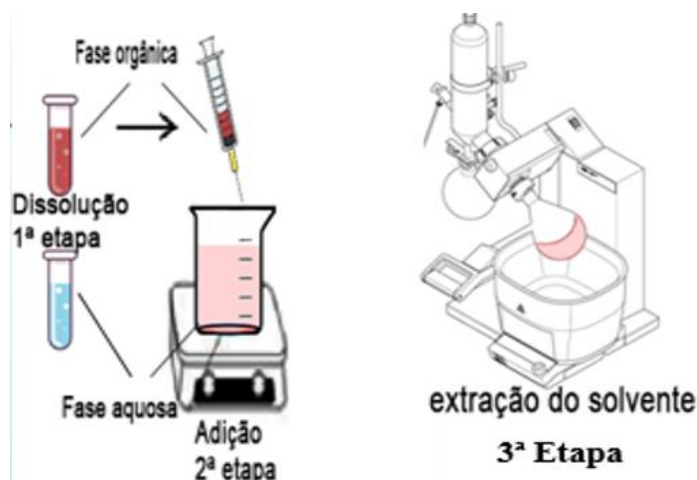
4.2. PROTOCOLO DE PREPARO DE NANOEMULSÃO CONTENDO CORANTE VERMELHO

As NE foram preparadas pelo método descrito por Primo et al., (2011) (Figura 7) nas concentrações de 0,025 a 1,0 mg/ml de CV. As formulações foram preparadas com controle de temperatura ajustada em 55 °C, em um sistema utilizando-se banho com aquecimento acoplados em reatores encamisados com fundo cônico para tubos do tipo *Falcon*, de 50 ml, sob agitação magnética.

A fosfatidilcolina de soja foi adicionada a 1,5% m/v, dissolvida diretamente em 9,0 ml de acetona. Após sua total dissolução foi adicionado um volume de 250 µL de óleo Edenor (núcleo oleoso da NE), a esta solução denominamos fase orgânica. O CV foi então, totalmente dissolvido separadamente em acetona com ajuda de banho ultrassônico e adicionado a fase orgânica.

A fase orgânica foi então gotejada sob a solução aquosa contendo Pluronic F68 (1,25% m/v), (agente emulsificante, responsável pela estabilidade das NE) sob agitação moderada e constante a 250 rpm/55°C. Após o término do gotejamento houve a remoção do solvente orgânico residual do meio por rotaevaporação à 55 °C até obtenção do volume final de 10 ml.

Figura 7 -Esquema de Preparo Nanoemulsões.

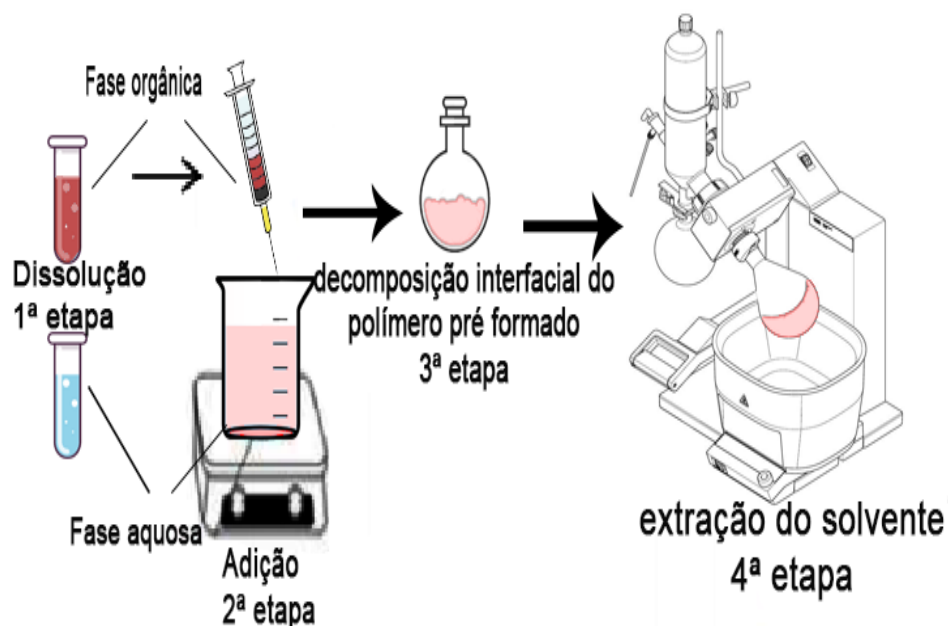


4.3. PROTOCOLO DE PREPARO DA NANOCÁPSULA POLIMÉRICA CONTENDO CORANTE VERMELHO E FTALOCIANINA DE CLORO ALUMÍNIO (CIAIPc)

As NC poliméricas foram preparadas usando o método de nanoprecipitação ou deposição interfacial de polímero pré-formado como descrito por Fessi et al., em 1989 (Figura 8) e colaboradores, com modificações. Este método permite a formação espontânea de gotículas nanométricas oleosas recobertas por uma membrana polimérica. Foram preparadas nanocápsulas somente com CV (CV/NC), somente com a CIAIPc (CIAIPc/NC) e nanocápsulas com associação dos ativos (CV_CIAIPc/NC), na concentração de 0,1 mg/ml de CV e 0,05 mg/ml de CIAIPc. O co-polímero PLGA 50:50 (0,75% m/v) e lecitina de soja (fosfatidilcolina de soja) a 1,75% m/v, foram pesados e dissolvidos em 15 ml de acetona a 40 °C. O CV foi dissolvido separadamente, também em acetona com ajuda de banho ultrassônico e adicionado a fase orgânica posterior a adição do óleo de soja, sendo a CIAIPc dissolvida separadamente nesta fase utilizando-se também banho ultrassônico.

A fase orgânica foi gotejada lentamente, sob a solução aquosa contendo Pluronic F-68 (1,25% m/v) em 30 ml de água sob agitação moderada e constante (250 rpm) a 40°C. Após 20 minutos, houve a remoção do solvente orgânico do meio por rotaevaporação 40 °C e rotação de 225 rpm, até obtenção de um volume final de 10 ml.

Figure 8 -Esquema de Preparo das Nanocápsulas.



4.4. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E NANOCAPSULAS

4.4.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

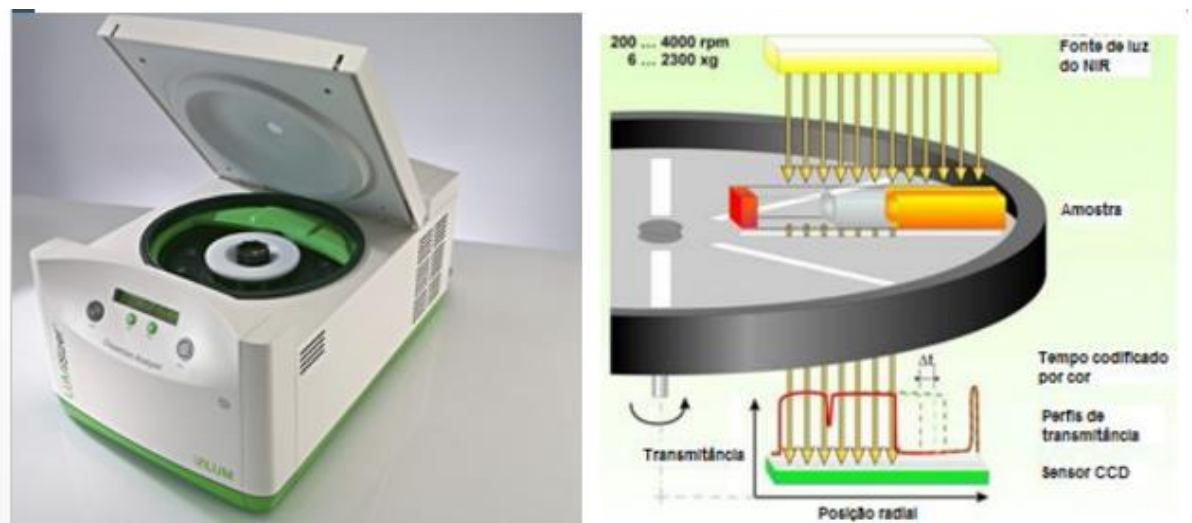
Para a caracterização físico-química, foram realizadas análises de tamanho de partícula (diâmetro hidrodinâmico), índice de polidispersidade (IPd) e potencial Zeta (ξ) das NE e NC, na ausência e presença do princípio ativo. As análises foram realizadas seguindo-se os procedimentos operacionais padrões do equipamento Zetasizer®, da *Malvern Instruments* cedido gentilmente pelo Prof. Dr. Rodrigo F. C. Marques do Departamento de Físico-Química do Instituto de Química de Araraquara - UNESP. As amostras foram preparadas diluindo-se 20 μ l de formulação em 2 ml de água ultrapura em cubeta de poliestireno de 10 mm para análises de tamanho e IPd; e transferidas para células eletrolíticas modelo DTS1060 da *Malvern Instruments* para análises de potencial Zeta.

4.4.2. CARACTERIZAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES COM USO DO LUMISIZER

Os estudos de estabilidade acelerada foram realizados em uma centrífuga analítica multi amostra LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha) (Figura 9). Foram adicionados 400 μ l das amostras, sem diluição prévia, em cubetas retangulares adequadas para o tipo de amostra

com posição radial máxima de 129,5 mm (10 mm de percurso óptico) e exposto a uma força centrífuga sob 2616 xg durante 4,5 horas a 25°C, com base nos perfis de transmissão registrados a cada 50 segundos.

Figura 9 - Representação do equipamento *Lumisizer* utilizado para nas medidas de estabilidade acelerada das nanocápsulas. Fonte: *DKSH Technology Pte Ltd* - Copyright© 2016.



4.4.3. ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

A MFA possui capacidade de fornecer imagens tridimensionais em alta resolução, diretamente da superfície topográfica dos materiais em análise, possuindo certas vantagens metodológicas, como não sendo necessário o recobrimento com material condutor, além de não necessitar de métodos específicos de preparação de amostras. Desta forma, a MFA possui características que são muito úteis para a caracterização de materiais em escala nanométrica (REGGENTE et al., 2015).

As imagens das NC em estudo foram obtidas a temperatura ambiente, sem a necessidade de recobrimento da amostra, utilizando o equipamento *Scanning Probe Microscope* modelo SPM-9600, da Shimadzu e software SPM Online, fornecido pela Shimadzu do Laboratório de Microscopia de Força Atômica do Departamento de Química da FFCLRP-USP. Em uma superfície de mica foi depositada uma gota (5,0 μL) das formulações CV/NC e CV_CIAIPc/NC, submetidas então a secagem natural. As imagens foram obtidas pelo modo de contato intermitente, com cantilever de 124 μm de comprimento, operando em

uma frequência de ressonância no intervalo de 324-369 KHz, rigidez de 34-51 N/m e força constante. Os resultados dimensionais foram processados usando o software do programa. No mínimo dez imagens de cada amostra foram analisadas para garantir resultados reprodutíveis.

4.5. ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS.

Os espectros de absorção e emissão de fluorescência do CV e da ClAlPc em meio homogêneo dimetil-sulfóxido (DMSO) das CV/NC, CV_ClAlPc/NC e ClAlPc/NC foram obtidos como parte da caracterização espectroscópica. Os espectros foram obtidos utilizando-se cubetas de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico, para as análises de absorção foi utilizado o espectrofotômetro UV/Vis de feixe duplo Genesys 10s da *Thermo Scientific*.

Para as análises de fluorescência das amostras contendo o CV livre e em NC (CV, CV/NC e CV_ClAlPc/NC) estabeleceu-se um protocolo com excitação fixa em 480 nm, tempo de integração de 0,3 s, fendas de excitação e emissão de 3,0/3,0 nm respectivamente e faixa de aquisição de 490 a 600 nm. Para as análises de fluorescência das amostras que continham a associação com ClAlPc (ClAlPc, CV_ClAlPc/NC e ClAlPc/NC) foi utilizada excitação fixa em 615 nm e tempo de integração de 0,3 s, fendas de excitação e emissão de 3,0/3,0 nm respectivamente, e faixa de aquisição de 630 a 700 nm, utilizando-se espectrofluorímetro da *Shimadzu* modelo RF-6000.

4.6. CURVA ANALÍTICA: LINEARIDADE DO CORANTE VERMELHO

A linearidade de um método analítico é a capacidade de se obter resultados experimentais diretamente proporcionais a concentração do analito. Com isso, as análises de regressão linear foram realizadas construindo um gráfico de densidade óptica versus concentração do corante em µg/ml.

Para construção da curva, foi preparado inicialmente uma solução estoque de 1,0 mg/ml do CV em DMSO. Para o preparo das soluções de diferentes concentrações foi utilizado o método de diluições sucessivas, utilizando-se uma cubeta de quartzo com 1,0 cm de caminho óptico, contendo 2,0 ml de DMSO, adicionando-se frações da solução estoque com micro-seringas (Hamilton Co.) de 50 µl para se obter as concentrações desejadas.

4.6.1. QUANTIFICAÇÃO DE CV E CIAIPc EM NANOCÁPSULAS POLIMÉRICAS

A CIAIPc presente nas formulações foi quantificada seguindo o método de quantificação da ftalocianina de cloro-alumínio em nanocarreadores, descrito e validado por Siqueira-Moura colaboradores (2010). Para o CV, foi utilizada a curva de correlação como descrito na seção 4.6. Para isso foi necessário o rompimento das nanocápsulas evitando assim interferência da camada polimérica e bicamada lipídica nos estudos espectroscópicos. Para quantificação do CV nas CV/NC e CV_CIAIPc/NC, inicialmente uma alíquota de NC (500 µl) foi adicionada a um balão volumétrico de 5ml e completou-se até o menisco com DMSO. A amostra foi sonicada por 10 min (Banho-Ultrassônico Bramson 1510), garantindo assim total liberação do analito da formulação no solvente, após a sonicação foi adicionado 2,0 ml em uma cubeta de quartzo com caminho óptico de 1,0 cm e analisadas no espectrofotômetro como descrito na seção 4.5. Para quantificar a CIAIPc nas formulações, CV_CIAIPc/NC e CIAIPc/NC, foi utilizado o protocolo descrito por Siqueira-Moura e colaboradores (2010), em um microtubo foi adicionado 60 µl de NC e 60 µl de DMSO e sonicado por 10 min garantindo assim total liberação do analito da formulação no solvente, após a sonicação foi adicionado 120 µl da solução inicial e 2 ml de acetonitrila e analisadas no espectrofotômetro como descrito na seção 4.5.

4.7. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DO CV E CIAIPc NAS NC

As quantidades dos ativos encapsulados foram determinadas através da quantidade não incorporada, o método utilizado para essa separação foi o de ultrafiltração e centrifugação. Inicialmente a amostra foi adicionada a um tubo de ultrafiltração de centrífuga (Millipore Amicon®) de 30kda, o qual foi adicionado a uma centrífuga a 12.857×g durante 1 h, a 4°C. Ao término de uma hora, o sobrenadante foi separado para análise em cubeta de quartzo.

A taxa de incorporação do corante foi calculada de acordo com a correlação direta entre a quantidade de corante total e a concentração dosada, conforme apresentado na Equação 1:

$$E.E. (\%) = \frac{TPc - LPc}{TPc} \quad (1)$$

$$\text{TPc} \times 100$$

Onde TPc representa à concentração total de corante na formulação e LPc a concentração de corante presente no sobrenadante da amostra.

O corante foi quantificado pelos métodos espectro-analíticos utilizando a equação obtida na curva de correlação apresentados na seção 4.6, com as devidas correções das diluições.

4.8. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA

Para as medidas de tempos de vida de fluorescência foram medidas usando o *Time-resolved confocal fluorescence microscope* modelo MT200 da *PicoQuant*, Inc. (Berlin, Alemanha). A técnica utilizada para as medidas foi a *Time-Tagged Time-Resolved* (TTTR) desenvolvida pela *PicoQuant*, que é uma variação do método clássico de *Time-Correlated Single Photon Counting* (TCSPC) (JAYME; CALORI; TEDESCO, 2016). Para todas as formulações foi utilizada a excitação fixa na escala de picosegundos, empregando-se como fonte de excitação um laser de diodo, direcionado por um espelho dicróico, z440bcm AHF/Chroma (Berlin, Alemanha), para isso foram adicionados 30 µL das amostras em uma lâminula de vidro do aparelho e realizada as análises das seguintes amostras: CV/DMSO_ACN, CV/NC, CV_CLAIPc/NC E CLAIPc/NC. Nestes ensaios foi utilizado comprimento de onda fixo em 470 nm para excitação do CV e de 560 nm para a CLAIPc, tanto na forma livre, como nanoencapsulados. A largura de pulso do laser foi menor que 70 ps e a taxa média de repetição de 80 MHz. A aquisição da fluorescência foi realizada depois de passar por um filtro que bloqueia qualquer radiação de reflexão e excitação (filtro de emissão e HQ460LP chroma, Berlin, Alemanha). Os ajustes dos dados foram realizados pelo software *SymPhoTime 64* da *PicoQuant* (Berlin, Alemanha) e sua inspeção foi realizada pela avaliação dos gráficos dos resíduos e do parâmetro estatístico χ^2 (chi-quadrado).

4.9. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MITOCONDRIAL ATRAVÉS DO TESTE DE MTT

A citotoxicidade das formulações (CV/NC, CV_CLAIPc/NC) e do CV livre foram avaliadas pelo teste fotocolorimétrico brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazolio MTT, o qual consiste na determinação indireta da atividade mitocondrial celular em condições *in vitro* pelo monitoramento da produção do corante formazan, utilizando a espectroscopia de absorção no UV-Vis (MOSMANN, 1983). O modelo biológico utilizado

foi a linhagem comercial de fibroblastos de murino (NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658). As células NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658™ foram cultivadas em estufa com 5% de (CO₂, a 37°C) para suplementação das células utilizou-se meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEN; Gibco BRL, EUA) suplementado com 2,0 mmol.L⁻¹ de glutamina, 100 U.mL⁻¹ de penicilina, 0,1 mg.mL⁻¹ de estreptomicina e 10% e soro fetal bovino (Cultlab, Campinas/Brasil). Inicialmente as células foram cultivadas até atingirem a confluência, e então, retiradas dos frascos de cultura utilizando tripsina, com subsequente centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio DMEN suplementado. Os testes de contagens das células na câmara de Neubauer foram feitos com alíquotas de 100 µl desta suspensão ao qual foram adicionados 100 µl de solução de Azul de Tripán 0,4%, como descrito por Freshney em 1994. A contagem dentro da câmara foi realizada em um microscópio óptico Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) no campo claro com uma objetiva de aumento de 10 X. Foram contadas apenas as células viáveis (não coradas em azul). Para os ensaios in vitro de toxicidade foi padronizada uma concentração celular de 5x 10³ células/poço, as quais foram semeadas em placas de cultura de 96 poços. Após contagem e plaqueamento das células, as placas foram incubadas à 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após esse período foi adicionado o CV nas proporções de 2,5%-50%, CV/NC nas proporções de 5%-50%, CV_CIALPc/NC nas proporções de 2,5%-50%, utilizando meio DMEN com 3% de soro fetal bovino (SFB) para as diluições. Como controle utilizou-se um conjunto de 16 poços contendo células saudáveis e sem adição da formulação de NC. As células foram incubadas com as amostras por um período de 3 horas protegidos da luz. Posteriormente, os meios foram retirados e substituídos por meio DMEN suplementado. O ensaio de viabilidade celular usando (MTT) foi realizado conforme protocolos descritos por Mosmann colaboradores (1983). Após 24 h do tratamento das células com as formulações em estudo adicionou-se 170 µl de meio DMEN sem vermelho de fenol e sem suplementação bem como 30 µl de solução de MTT (5 mg.mL⁻¹) a cada poço. As células foram re-incubadas por 4 h em estufa a 37°C e 5% de CO₂, sendo por fim retirado o meio contendo MTT e adicionado 200 µl de 2-propanol para dissolver o produto obtido. As leituras espectrofotométricas dos poços foram realizadas em 560 nm com correção de absorção basal em 690 nm em leitor de microplacas Tecan Safire II (Tecan Group, Grödig, Áustria). Os resultados foram apresentados como porcentagem em relação ao controle calculados segundo a Equação (2), e o experimento realizado em triplicata:

$$\text{Células viáveis(\%)} = (\text{Absorbância}_{\text{amostra}} / \text{Absorbância}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (2)$$

4.10. ENSAIO DE VIABILIDADE CELULAR USANDO METODO DA RESAZURINA

Foram realizados ensaio de viabilidade celular utilizando o método da resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido, Sigma-Aldrich Co., MO, EUA) para avaliar a citotoxicidade das NC (Vazia/NC, CV/NC e CV_CLAIPc/NC). A resazurina é um corante azul, o qual é internalizado por células viáveis e metabolizado e reduzido a resorufina, que possui coloração rosa que possui máximo de absorção em 570 nm e emissão 590 nm e pode ser quantificado por absorção ou fluorescência (JAYME et al., 2017). Nesse estudo, utilizou-se também a espectroscopia de absorção para quantificar a quantidade de células viáveis. Para isso foi empregado um leitor de microplacas Tecan Safire II (Tecan Group, Grödig, Áustria).

O modelo biológico utilizado foi linhagens comerciais de fibroblasto de murino (NIH/3T3 - ATCC® CRL-1658). As células NIH/3T3 foram cultivadas em estufa com 5% de (CO₂, a 37°C). Inicialmente as células foram cultivadas até atingirem a confluência, e então, retiradas dos frascos de cultura utilizando tripsina, com subsequente centrifugação a 2500 rpm por 10 minutos. Em seguida, as células foram ressuspensas em meio DMEN suplementado. Os testes de contagens das células na câmara de Neubauer foram feitos com alíquotas de 100 µl desta suspensão ao qual foram adicionados 100 µl de solução de Azul de Tripán 0,4%, como descrito por Freshney (1994). A contagem dentro da câmara foi realizada em um microscópio óptico Axiovert 40 CFL (Carl Zeiss, Göttingen, Alemanha) no campo claro com uma objetiva de aumento de 10 X. Foram contadas apenas as células viáveis (não coradas em azul). Para os ensaios in vitro de toxicidade foi padronizada uma concentração celular de 5×10^3 células/poço, as quais foram semeadas em placas de cultura de 96 poços e incubadas por 24 horas. Após 24 horas da incubação adicionou as CV/NC e CV_CLAIPc/NC nas proporções de 5%, 15%, 25% e 50%, utilizando meio DMEN com 3% de SFB para as diluições. Como controle utilizou-se um conjunto de 16 poços contendo células saudáveis e sem adição da formulação de NC, para avaliar a citotoxicidade das NC sem ativo (Vazia/NC) utilizou-se um conjunto de 16 poços contendo células saudáveis e adição da formulação de Vazia/NC na proporção de 50%. As células foram incubadas com as amostras por um período de 4 horas protegidos da luz. Posteriormente, os meios foram retirados e substituídos por meio DMEN suplementado. Após 24 horas. O ensaio de viabilidade celular com resazurina foi realizado baseado no protocolo descrito por Jayme e colaboradores (2017). Inicialmente foi necessário realizar a padronização para o tempo de incubação da resazurina, para isso foi utilizado uma

placa de 24 poço. As células NIH/3T3 foram contadas e plaqueadas na densidade de $5,0 \times 10^3$ células por poço. Após 24 horas de incubação, foram adicionados 200 μL de uma solução de resazurina (25 $\mu\text{g/ml}$ em DMEM sem fenol vermelho) e 1,8 ml de do mesmo meio, após 3 horas de incubação foi retirada uma alíquota do sobrenadante de um poço e realizada a leitura em espectrofotômetro de absorção, a placa continuou incubada e repetida a leitura no tempo de 4 e 5 horas de incubação, afim de avaliar o melhor tempo para a internalização da resazurina nas células NIH/3T3, o melhor tempo de incubação foi de 4 horas. Após 24 horas do tratamento das células com as formulações em estudo adicionou-se 20 μL de solução de resazurina (25 $\mu\text{g/ml}$ em DMEM sem fenol vermelho) e 180 μL do mesmo meio, e incubou-se por 4 horas, e na sequência foram realizadas as leituras espectrofotométricas dos poços em 570 nm, com correção de absorção basal em 590 nm. Os resultados foram apresentados como porcentagem em relação ao controle calculados segundo a Equação 3:

$$\text{Células viáveis(\%)} = (\text{D.O.}_{\text{amostra}} / \text{D.O.}_{\text{controle}}) \times 100 \quad (3)$$

5. RESULTADO E DISCUSSÕES

5.1. CARACTERIZAÇÃO DAS NANOEMULSÕES E NANOCÁPSULAS

5.1.1. DETERMINAÇÃO DO TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA

O comportamento dos nanomateriais em meio biológico está diretamente relacionado com suas propriedades físico-químicas (TREUEL, 2014; BHATTACHARJEE, 2016). Por isso é extremamente importante obter dados confiáveis para que as nanopartículas possam ser caracterizadas de forma adequada (BHATTACHARJEE, 2016). O tamanho de partícula e a carga de superfície (potencial Zeta) são dois fatores responsáveis por muitos efeitos biológicos dos nanomateriais, incluindo a dissolução, toxicidade e absorção celular (BHATTACHARJEE, 2016).

Esses parâmetros, unidos ao índice de polidispersividade (PdI), são utilizados para monitoramento de estabilidade de nanomateriais coloidais. O tamanho de partícula $\leq 250\text{nm}$, permite que as vias de administração sejam ampliadas, e promove o efeito de acumulação passiva em tecidos lesionados, desta forma podemos ter uma seletividade para o tratamento de diversas doenças, o PdI é um índice que caracteriza o quão homogênea é a formulação e o quão dispersa estão as partículas (DOS SANTOS et al., 2016), o índice $\leq 0,3$ garante que a formação de aglomerados, e por consequência alteração do tamanho de partícula, ocorram com menos frequência, o potencial Zeta também é um parâmetro muito importante, pois representa a carga superficial da partícula ou seja, a partir dele é possível prever estabilidade da formulação, pois quanto maior o seu potencial em modulo, maior será a repulsão das partículas com isso a formação de aglomerados que fazem com que as partículas aumente de tamanho e por consequência a perda de estabilidade seja menor. Além disto, este parâmetro auxilia diretamente no desenvolvimento de formulações com modulação de carga superficial, visando a melhoria de interação biológica, atração por sítios específicos, e aumento da seletividade com o tecido alvo. (MARÍN; BABICK; HILLEMANN, 2017).

Inicialmente foi preparada uma série de sete nanoemulsões com concentrações diferentes de princípio ativo, variando-se de 0,025 a 1,0 mg/ml (Tabela 2). Foram analisados o tamanho de partícula afim de determinar a melhor relação de concentração de ativo em função dos melhores resultados dos parâmetros acima citados e que foram analisados.

Tabela 2 - Dados de tamanho de partícula, índice de polidispersividade e potencial Zeta das nanoemulsões contendo diferentes concentrações de CV

Concentração de CV /mg/ml	Tamanho médio de Partícula /nm	PdI	Potencial Zeta /mV
0,025	329,7	0,8	-25,3
0,05	230,0	1,0	-23,8
0,100	184,1	0,4	-38,7
0,200	204,2	1,0	-36,5
0,500	343,8	0,9	-50,2
0,750	156,3	1,0	-35,5
1,000	510,3	0,8	-35,3

Com base nos dados da Tabela 2 observamos que a concentração de 0,1 mg/ml mostrou os melhores parâmetros desejados, no entanto foi realizada uma nova medida após 7 dias, e os parâmetros não foram mantidos (Tabela 3) indicando a instabilidade relativa e possível agregação do coloide.

Tabela 3 - Parâmetros analisados da nanoemulsão com CV a 0,1mg/ml no 1º dia e após 7 dias

Tempo /dias	Tamanho médio de Partícula /nm	PdI
1	184,1	0,43
7	363,4	0,98

Com base nos dados das Tabelas 2 e 3 concluímos que as formulações obtidas não apresentaram os parâmetros físico-químicos desejados conforme os critérios mínimos esperados para sistemas coloidais nanoestruturados (tamanho de partícula < 250 e PdI ≤ 0,3), isso pode ter ocorrido devido ao fato de apesar de o tamanho de partícula e potencial Zeta apresentarem valores desejados inicialmente (Tabela 2) o PdI estava acima do valor desejado (≤0,3). Como a estabilidade das partículas dependem de um conjunto ideal de resultados, conclui-se que inicialmente as formulações obtidas não apresentaram os parâmetros físico-

químicos esperados, o que pode ser efeito de interação direta do CV junto a formação das nanogotículas da NE.

Desta forma, foi necessário utilizar uma estratégia adicional baseada na alteração do processo de encapsulação do ativo, propondo a adição de um co-polímero para recobrimento e maior estabilidade coloidal, e por consequência a obtenção de nanocápsulas poliméricas como nanocarreador para o CV conforme descrito no protocolo apresentado na seção 4.3. Para isto foi utilizada a concentração inicial de 0,1 mg/L de princípio ativo, que foi a que conferiu melhor performance ao sistema nanoemulsionado sem recobrimento. Todas as amostras foram armazenadas em refrigerador (4 a 7 °C) durante todo o período de acompanhamento.

As Figuras 10, 11, 12 e 13 e a tabela 4 apresentam os gráficos dos resultados de tamanho médio de partícula, PdI, potencial Zeta em função do tempo das Vazia/NC, CV/NC, CVClAlPc/NC e ClAlPc/NC.

Figura 10 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, PdI e potencial Zeta em função do tempo para Vazia/NC.

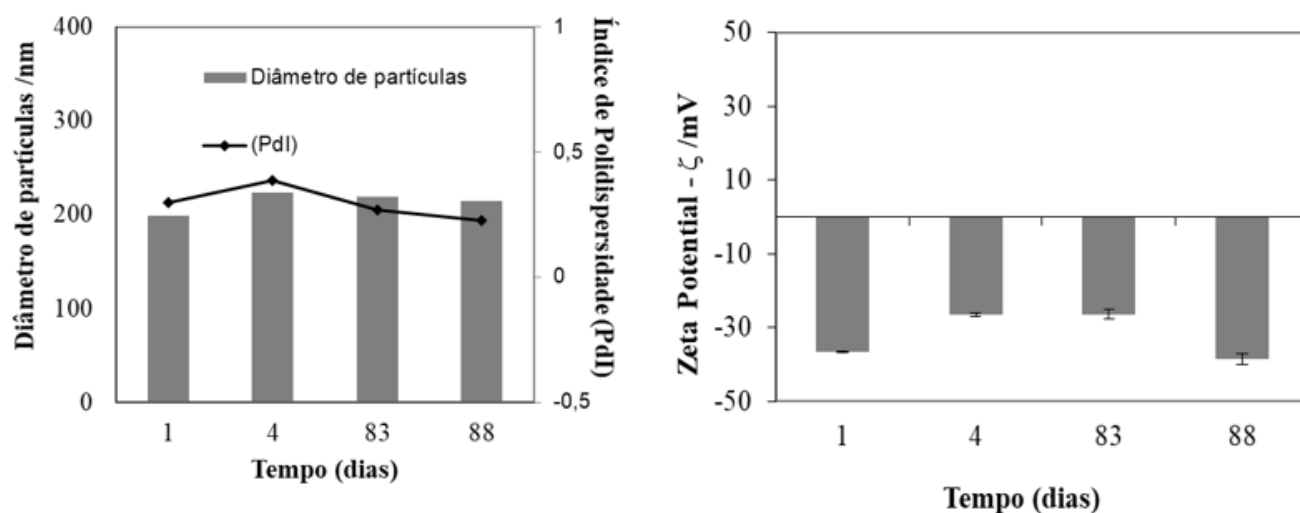


Figura 11 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl e potencial Zeta em função do tempo para CV/NC.

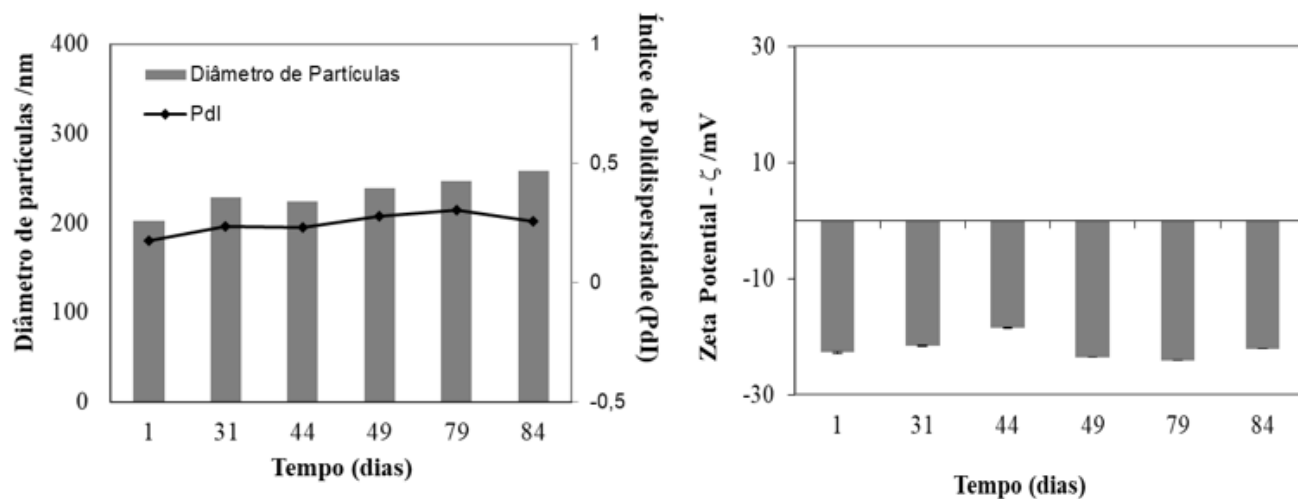


Figura 12 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, Pdl e potencial Zeta em função do tempo para CV_CLAIPc/NC.

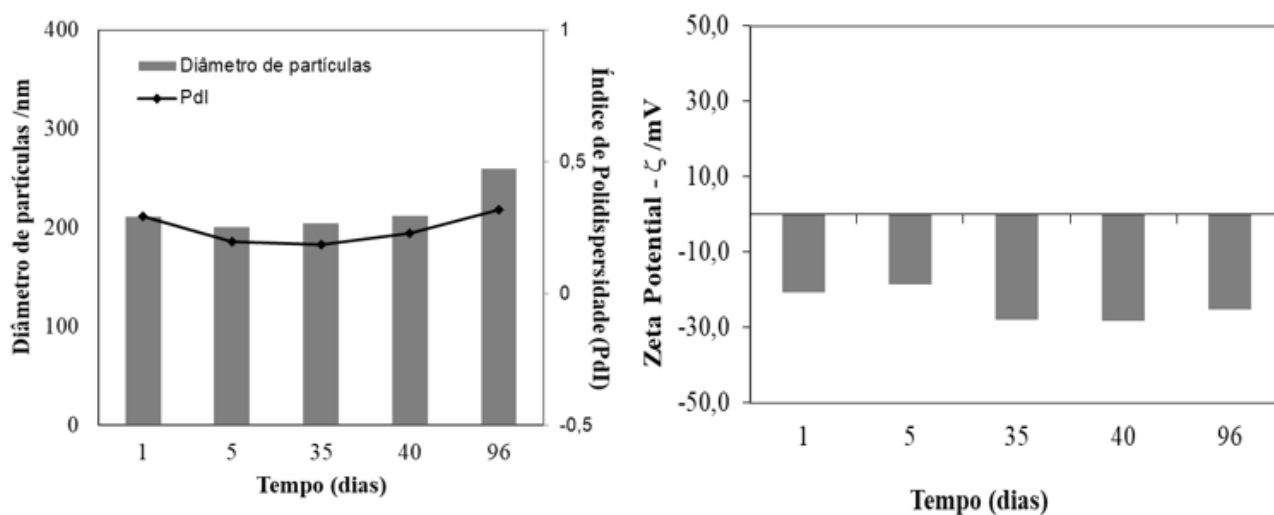


Figura 13 - Estudo de estabilidade monitorando-se o tamanho de partículas, PDI e potencial Zeta em função do tempo para CIAIPc/NC

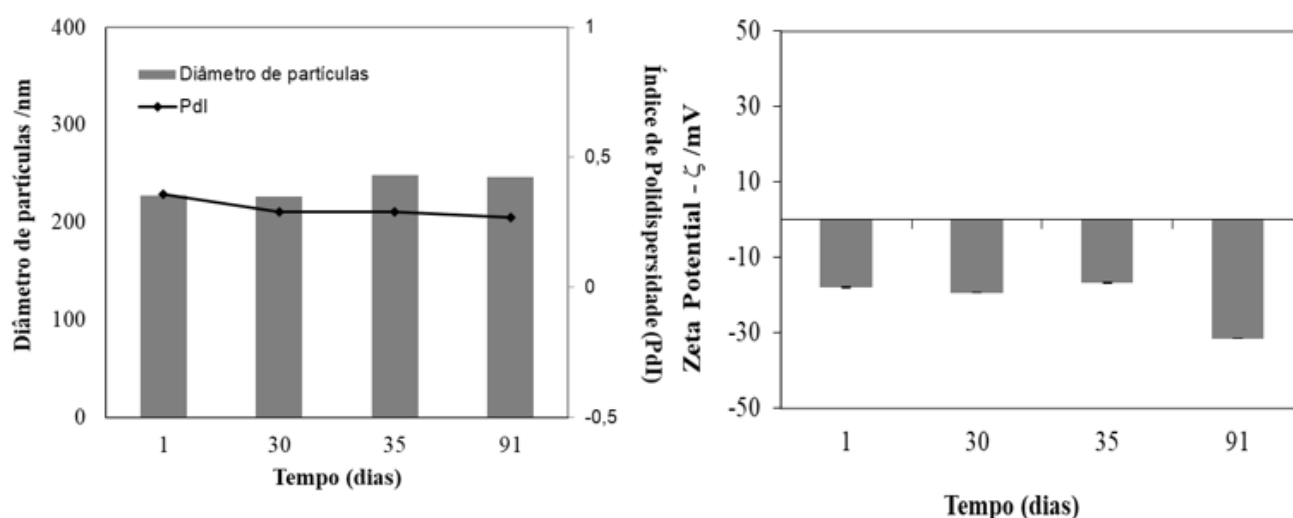


Tabela 4 - Dados de tamanho de partícula, PDI e potencial Zeta das nanocápsulas em função do tempo.

Amostra	Tempo /Dias	Tamanho Médio De Partícula /nm	PDI	Potencial Zeta /mV
Vazia/NC	88	213,83 $\pm$ 4,04	0,29 $\pm$ 0,01	-32,02 $\pm$ 0,90
CV/NC	84	233,33 $\pm$ 3,28	0,25 $\pm$ 0,01	-20,56 $\pm$ 1,24
CV_CIAIPc/NC	96	217,97 $\pm$ 3,81	0,22 $\pm$ 0,01	-21,15 $\pm$ 0,54
CIAIPc/NC	91	247,37 $\pm$ 2,81	0,35 $\pm$ 0,01	-21,40 $\pm$ 0,36

Os dados apresentados na Tabela 4 e nas figuras (11 e 13), indicam um perfil apropriado para o CV e CIAIPc nanoenpsulados. Temos dados interessantes também para o sistema misto (Tabela 4 e Figura 12) com associação dos dois compostos, caracterizados por tamanho de partícula < 250 nm, PDI $\leq 0,3$ e potencial Zeta próximo de -30 mV (-32 a -20 mV). Desta forma, estes resultados indicam que o material desenvolvido possui características desejadas, ou seja, com tamanho médio de partícula submicrônico. Além disto, os estudos de espalhamento dinâmico de luz demonstraram também que o sistema coloidal obtido possui

uma distribuição de partículas uniforme podendo ser classificado como um sistema parcialmente monodisperso em suspensão aquosa. O potencial Zeta obtido indicou que o nanomaterial em questão possui carga superficial e residual predominantemente negativa, característica comum de nanomateriais obtidos com revestimento de co-polímeros da classe dos polioxipropilenos e derivados do ácido poli-lático devido a exposição de grupamentos altamente carregados eletronicamente.

5.1.2. CARACTERIZAÇÃO DE ESTABILIDADE ACELERADA DAS FORMULAÇÕES COM USO DO LUMISIZER

A estabilidade de uma formulação é definida como o intervalo de tempo pelo qual suas propriedades e características, no momento de sua embalagem, são mantidas, não podendo passar de 10% de redução da sua atividade desde que os produtos de degradação ou alteração estejam identificados (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Os testes de estabilidade devem avaliar o efeito dos fatores ambientais sobre o nanomaterial, estes dados são utilizados para prever a vida útil da formulação bem como a maneira adequada de armazenamento.

Os estudos de estabilidade acelerada foram realizados na centrífuga analítica multi-amostra modelo LUMiSizer® (LUM GmbH, Alemanha) conforme apresentado na seção 4.4.2. O instrumento emprega a STEP™ -Tecnologia (extinção de perfis resolvido no tempo e no espaço), o que permite medir a intensidade da luz transmitida durante a centrifugação, como uma função de tempo e de posição, ao longo de todo o comprimento da amostra. Na faixa de 880 nm referente à infravermelha próximo (*near infrared* - NIR) ilumina toda a célula de amostra e a luz transmitida que é detectada por sensores dispostos linearmente através da amostra (acima e abaixo do suporte de detecção) (LERCHE; SOBISCH, 2014). A transmissão é convertida no coeficiente de extinção pela relação por $\log I/I_0$ e o número de partículas pode ser calculado. A progressão dos perfis de transmissão (Figura 14, 15, 16 e 17) obtidos contém a informação completa sobre a cinética de estabilidade das formulações identificando quaisquer alterações na amostra devido à formação de sobrenadantes, sedimentação, floculação, coalescência ou separação de fases. Com base nestes perfis de extinção, processos de separação de fase foram quantificados em relação à velocidade de clarificação, sedimentação e velocidade de flutuação de partículas, turvação residual, volume de fase separada (líquida ou sólida).

Figura 14 - Evolução dos perfis de transmissão da Vazia/NC, centrifugadas a 2616 xg por 4,5 h. Primeiro registro inferior, último perfil superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada a transmissão de luz.

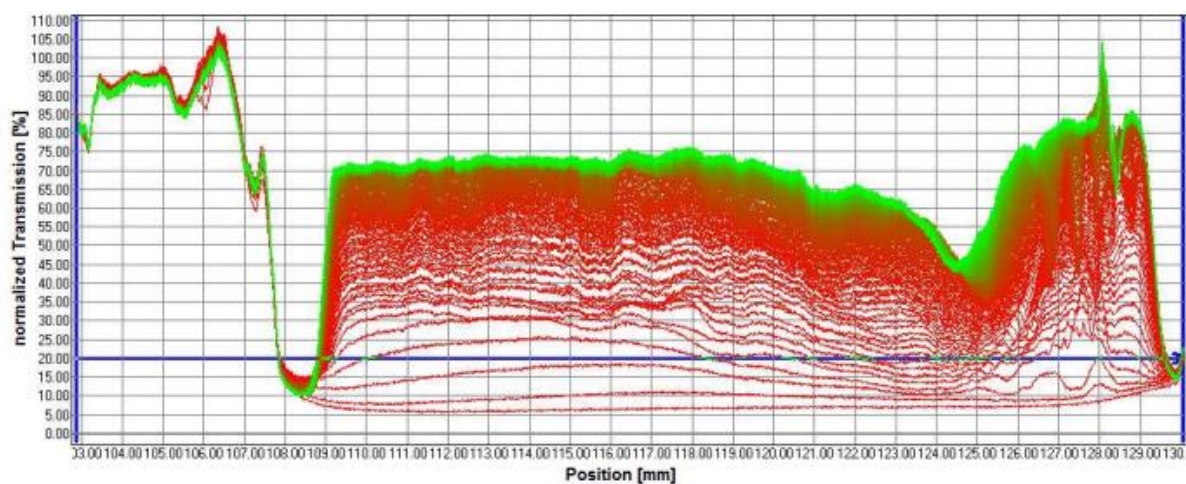


Figura 15 - Evolução dos perfis de transmissão da CV/NC, centrifugadas a 2616 xg por 4,5 h. Primeiro registro inferior, último perfil superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada a transmissão de luz.

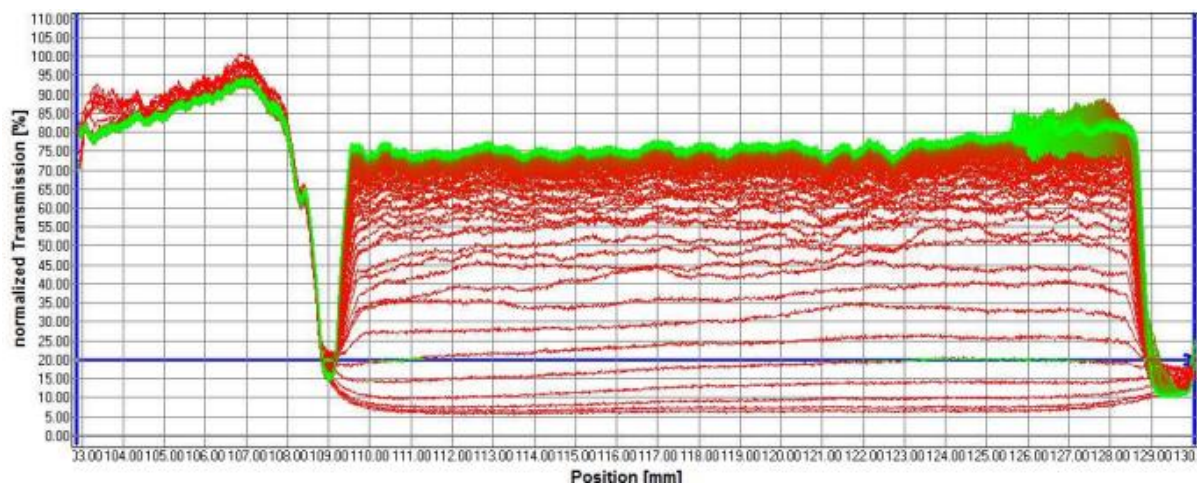


Figura 16 - Evolução dos perfis de transmissão da CV_CIAIPC/NC, centrifugadas a 2616 xg por 4,5 h. Primeiro registro inferior, último perfil superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada a transmissão de luz.

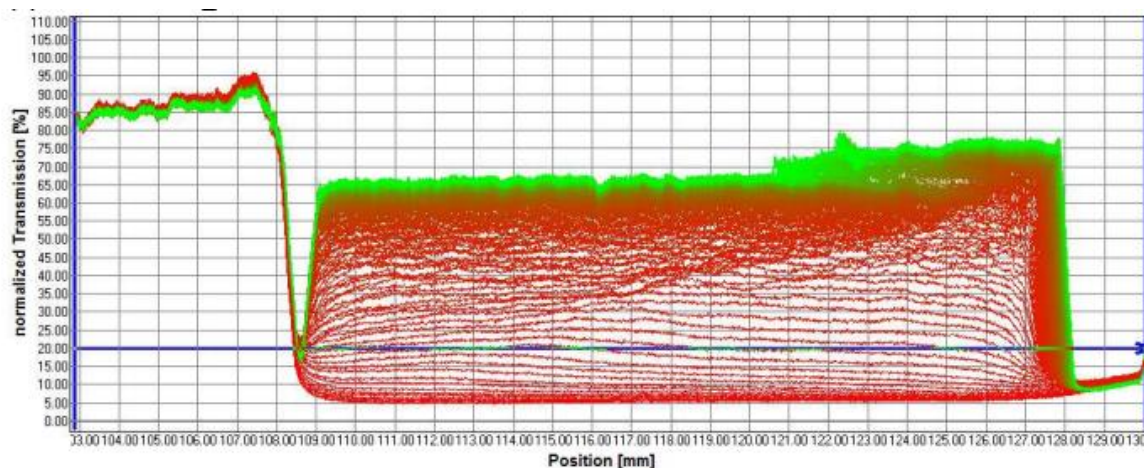
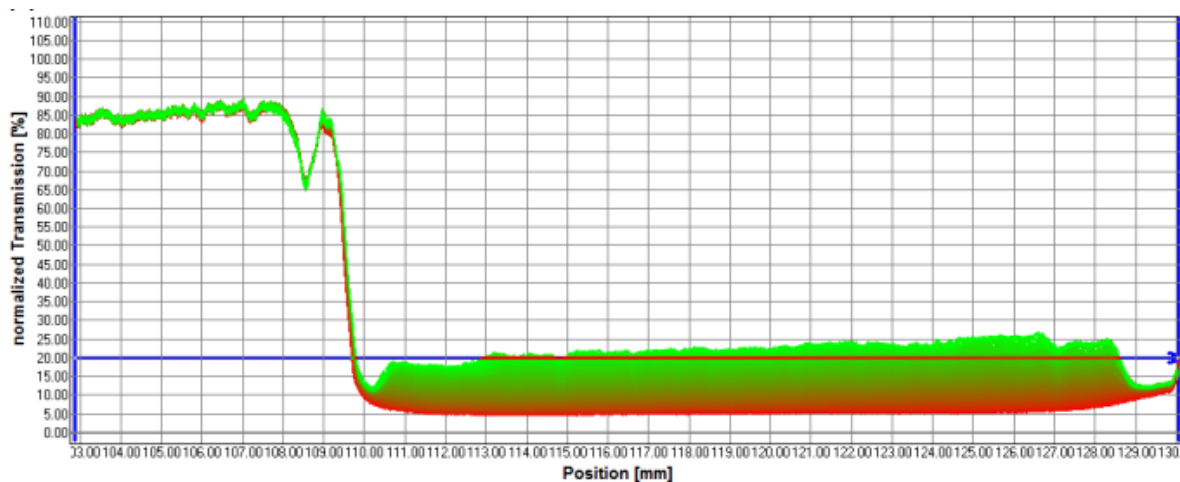


Figura 17 - Evolução dos perfis de transmissão da CV_CIAIPC/NC centrifugadas a 2616 xg por 4,5 h. Primeiro registro inferior, último perfil superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada a transmissão de luz.



Portanto com esta técnica, foi possível estudar a estabilidade acelerada e determinar o tempo de vida de prateleira para as formulações desenvolvidas (Vazia/NC, CV/NC, CV_CIAIPc/NC e CIAIPc/NC) sendo os dados quantitativos disponíveis pela integração dos perfis de transmissão (cinética da evolução das zonas de clarificação). A inclinação de tais gráficos (Figura 18) está diretamente relacionada com a estabilidade da amostra. A inclinação zero significa que não há mudança da concentração das partículas ao longo do tempo de medição, ou seja, alta estabilidade. Com isso, quanto maior for a inclinação da reta mais instável é a amostra. Através do acompanhamento da mudança entre o primeiro e último perfil, causados pela sedimentação, floculação ou viscosidade das partículas foi possível avaliar e prever o processo de desestabilização das nanopartículas (LERCHE; SOBISCH, 2014). Observamos a partir dos perfis de transmissão, que a formulação CIAIPc/NC é a mais estável, ou seja, o primeiro perfil de transmissão traçado em vermelho e o último perfil em CVCIAIPc/NC a diferença entre os perfis de transmissão ao longo da medida é grande, o que sugere que são menos estáveis que a CIAIPc/NC durante o mesmo período de tempo.

Figure 18 - Integral da Transmissão na dependência de tempo (s) para diferentes amostras de nanocápsulas usando LUMiSizer a 2616 xg por 4,5 h. a T = 25 °C

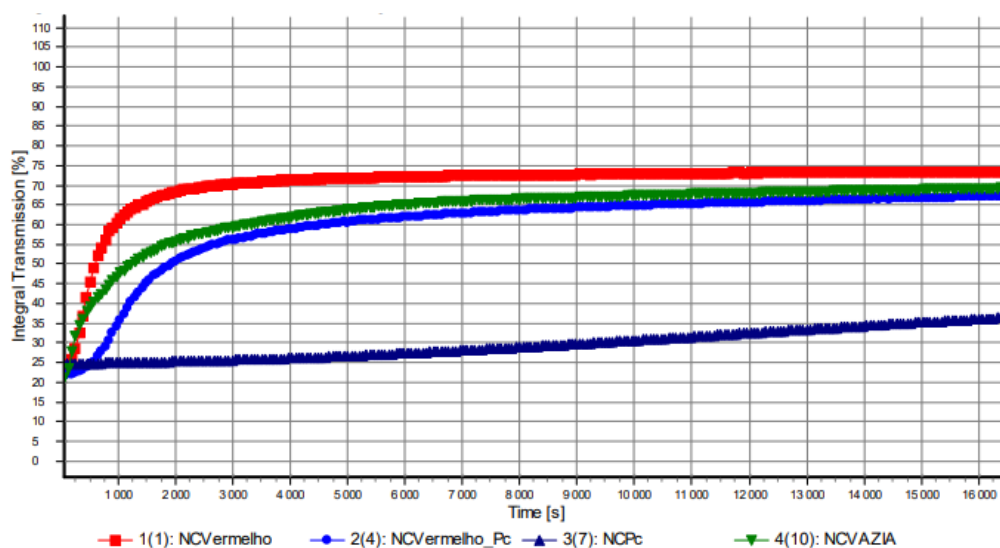


Tabela 5 - Taxa de separação representada pela inclinação e calculada pelo *software SEPView 5.1*, depois de integrar os arquivos de transmissão.

Amostras	Inclinação (% /hora)	Desvio padrão (%/hora)	Coefficiente de correlação
Vazia/NC	4,70	0,31	0,54
CV/NC	3,17	0,31	0,76
CV_CIAIPc/NC	5,94	0,22	0,76
CIAIPc/NC	2,74	0,25	0,99

Tabela 6 - Resultado dos tempos de vida de prateleira (*shelf-life*) de cada amostra

Amostras	<i>Shelf-life</i> (meses)
Vazia/NC	5,0
CV/NC	8,0
CV_CIAIPc/NC	5,0
CIAIPc/NC	8,0

O experimento foi realizado a temperatura de 25°C, ou seja, ele fornece a estabilidade da formulação armazenada nestas condições. Conforme estabelecido por Mora-Huertas, Fessi e Elaissari (2010), os valores de referência sugerem um percentual de até 10% de instabilidade de uma amostra, acima disso a amostra se torna inviável devido ser susceptível a degradação a curto prazo. O período de vida útil, que corresponde à medição do tempo de ensaio, é de 12 meses, sendo que o experimento tem duração de 4,5 horas, ou seja, a cada 1 hora equivale a 2 meses e meio relativamente. Como podemos observar na Tabela 5 a amostra Vazia/NC apresentou menor estabilidade com uma inclinação de 4,7%/hora, ou seja, sua estabilidade será de 5 meses (Tabela 6), já a amostra CV/NC e CIAIPc/NC apresentaram maior estabilidade com inclinação de 3,17 e 2,74%/hora (Tabela 5), respectivamente, ou seja, uma estabilidade de 8 meses (Tabela 6). A encapsulação dos ativos, tanto CV quanto a CIAIPc conferiram maior estabilidade para as nanocápsulas. No entanto a associação dos dois

em uma mesma formulação (CVCIAIPc/NC) levou a uma menor estabilidade com inclinação de 5,94 %/hora (Tabela 5) ou seja um tempo de estabilidade de aproximadamente 5 meses (Tabela 6).

Esses resultados são bastante satisfatórios, se compararmos com outros sistemas nanoestruturados tais como, os lipossomas e vesículas lipídicas, que apresentam estabilidade de 3 semanas à 2 meses (CALORI; TEDESCO, 2016; ZHOU et al., 2014).

5.1.3. ESTUDOS DE MICROSCOPIA DE FORÇA ATÔMICA (MFA)

As análises topográficas MFA tridimensional (3D) das CV/NC e CV_CIAIPc/NC (Figura 19) apresentaram imagens nítidas de partículas com formato esférico bem definido, sendo que as micrografias dos perfis topográficos forneceram os valores de tamanho médio de partícula de 104 nm ($\pm 0,04$) para $n = 35$ partículas de CV/NC (Figura 20 e 22) e 211 nm para CV_CIAIPc/NC (Figura 21 e 23), esses dados estão em concordância com o esperado, visto que as análises realizadas previamente pela técnica de DLS indicam que as partículas possam apresentar um tamanho um pouco maior por se tratar de uma medida do raio hidrodinâmico da partícula ou raio de solvatação. Desta forma, as micrografias confirmam o tamanho médio submicronico, com morfologia esférica e dimensões nanoestruturadas com distribuição homogênea.

Figura 19 - Fotomicrografias tridimensionais e bidimensionais obtidas das formulações CV/NC (A) e CV_CIAIPc/NC (B) por microscopia de força atômica.

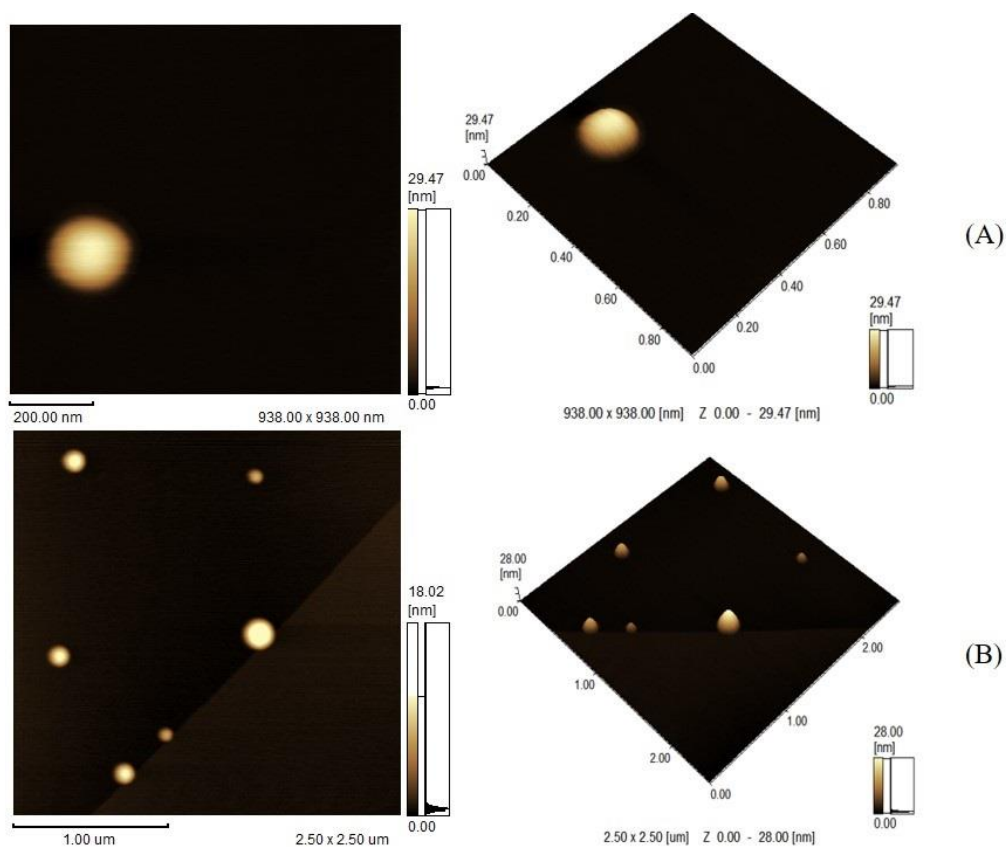


Figure 20 - Fotomicrografia bidimensional e perfil topográfico dada pela análise do software mostrando medições do diâmetro e altura das CV/NC.

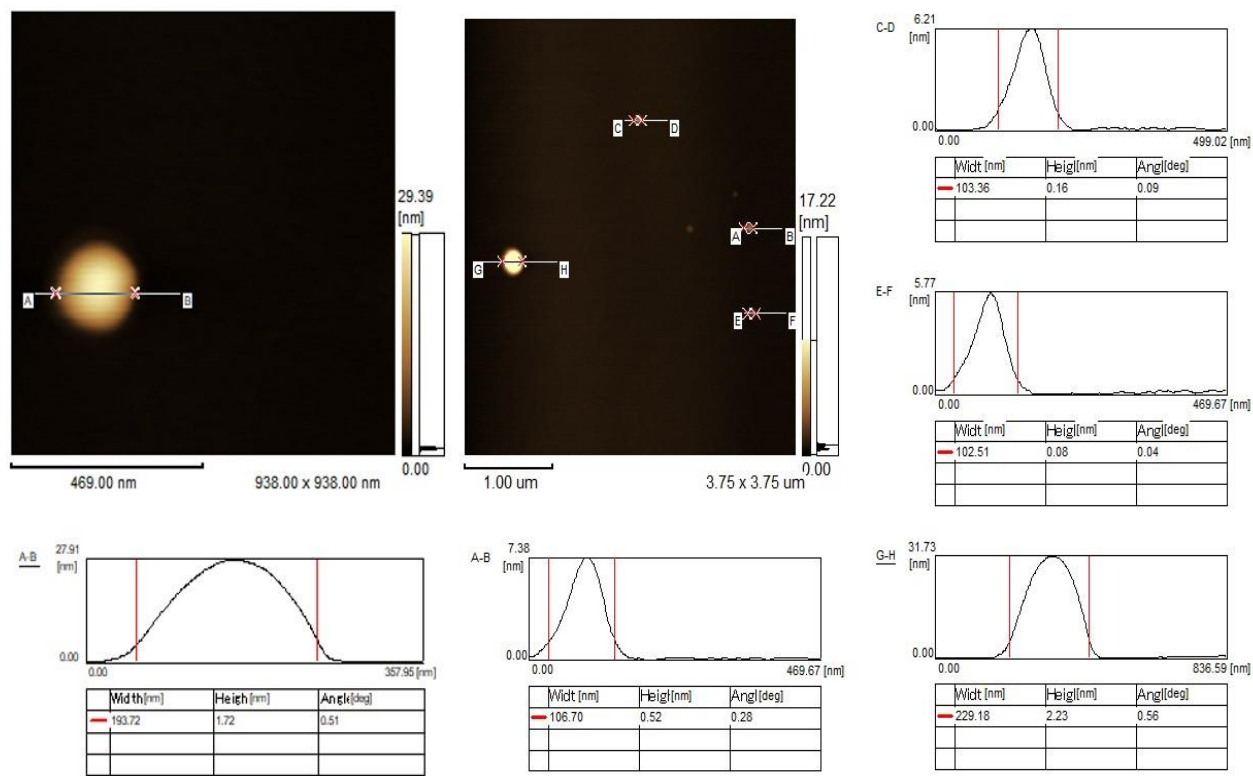


Figura 21 - Fotomicrografia bidimensional e perfil topográfico dada pela análise do software mostrando medições do diâmetro e altura das CV_CIAIPc/NC.

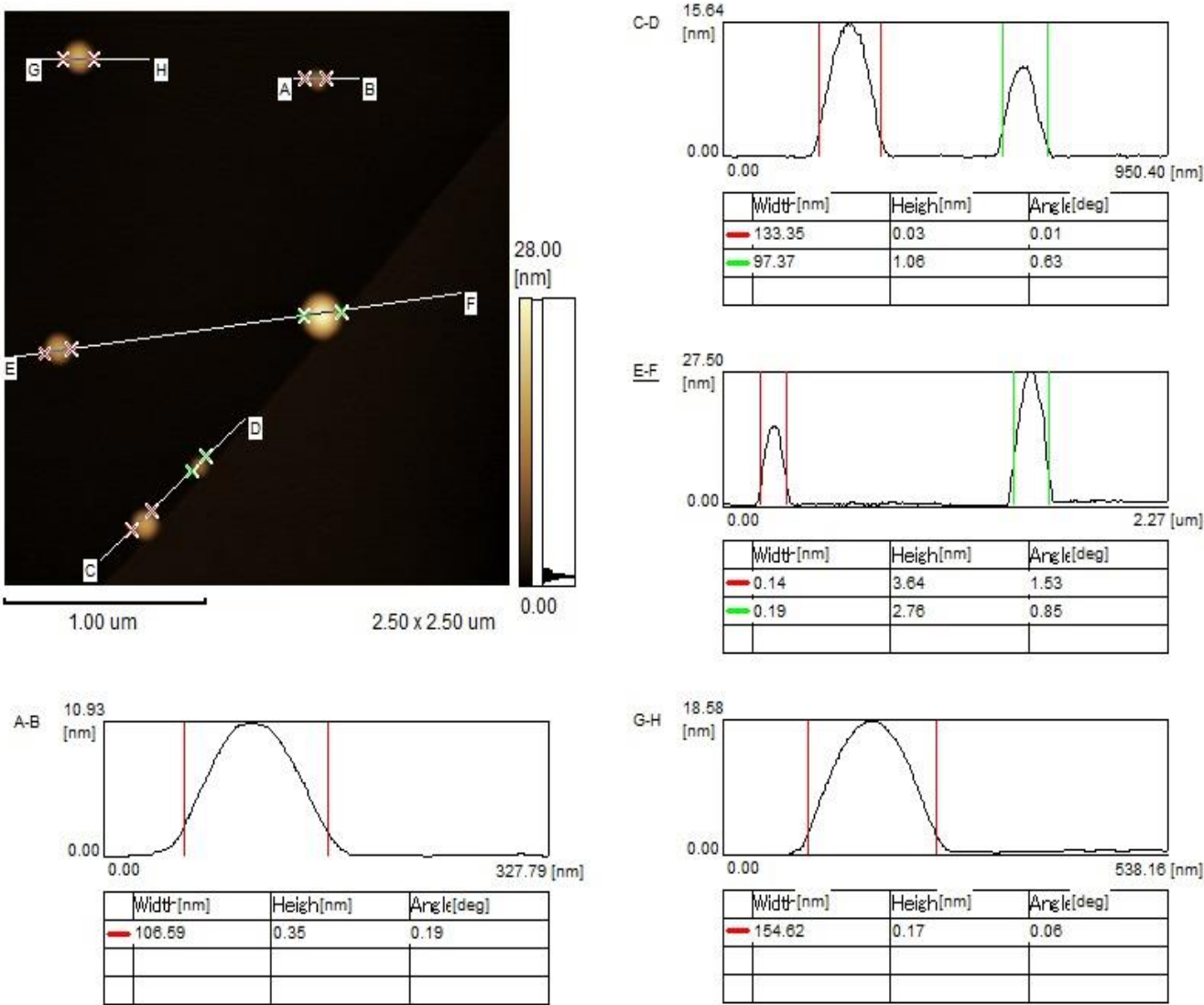


Figura 22 - Fotomicrografia bidimensional e histograma mostrando a distribuição do tamanho de partícula em função do número de amostras para CV/NC.

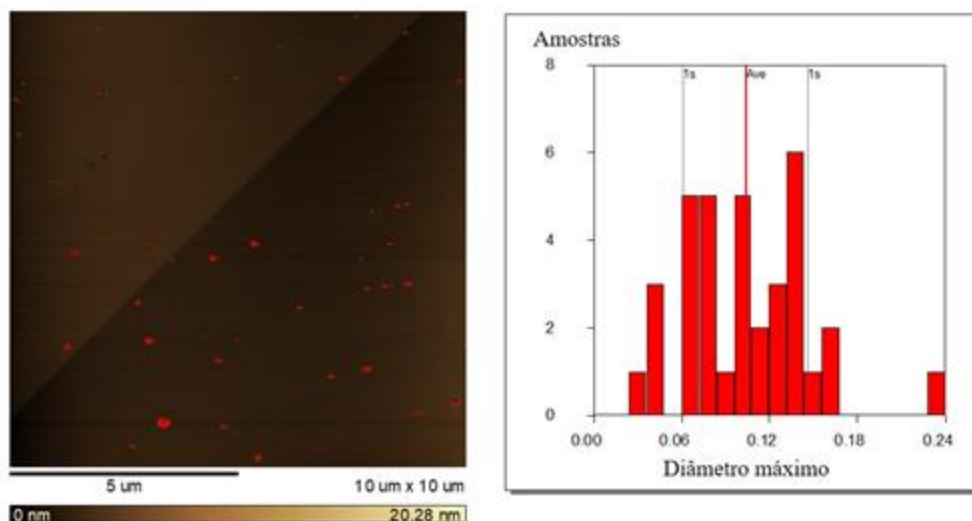
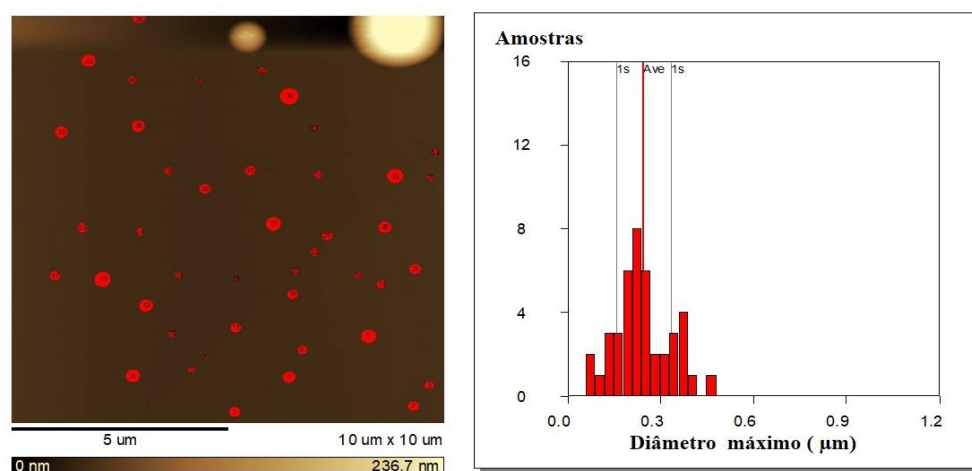


Figura 23 - Fotomicrografia bidimensional e histograma mostrando a distribuição do tamanho de partícula em função do número de amostras para CV_CIAIPc/NC.



As análises de diferença de fase mostraram ausência de rugosidade e ou deformações na superfície das partículas (Figuras 24 e 25), com isso é possível afirmar que a superfície da partícula é homogênea, isso significa que as superfícies das NC são compostas apenas por um material, ou seja o PLGA. Além disto, é possível afirmar também que os ativos encapsulados se encontram no interior da partícula e não adsorvidos na superfície, caso os ativos estivessem na superfície das partículas seria possível ver nas imagens alterações na coloração e

conformação superficial, ou outras partículas com coloração diferente ao entorno das NC (BOLEAN et al., 2017). Também é possível supor que todo o ativo foi encapsulado, isso porque não é observada a presença de agregados moleculares de ativo e polímeros no meio externo das NC, sendo que essa afirmação poderá ser confirmada com os resultados discutidos da seção 5.4.

Figura 24 - Fotomicrografia bidimensional das análises de diferença de fase da CV/NC.

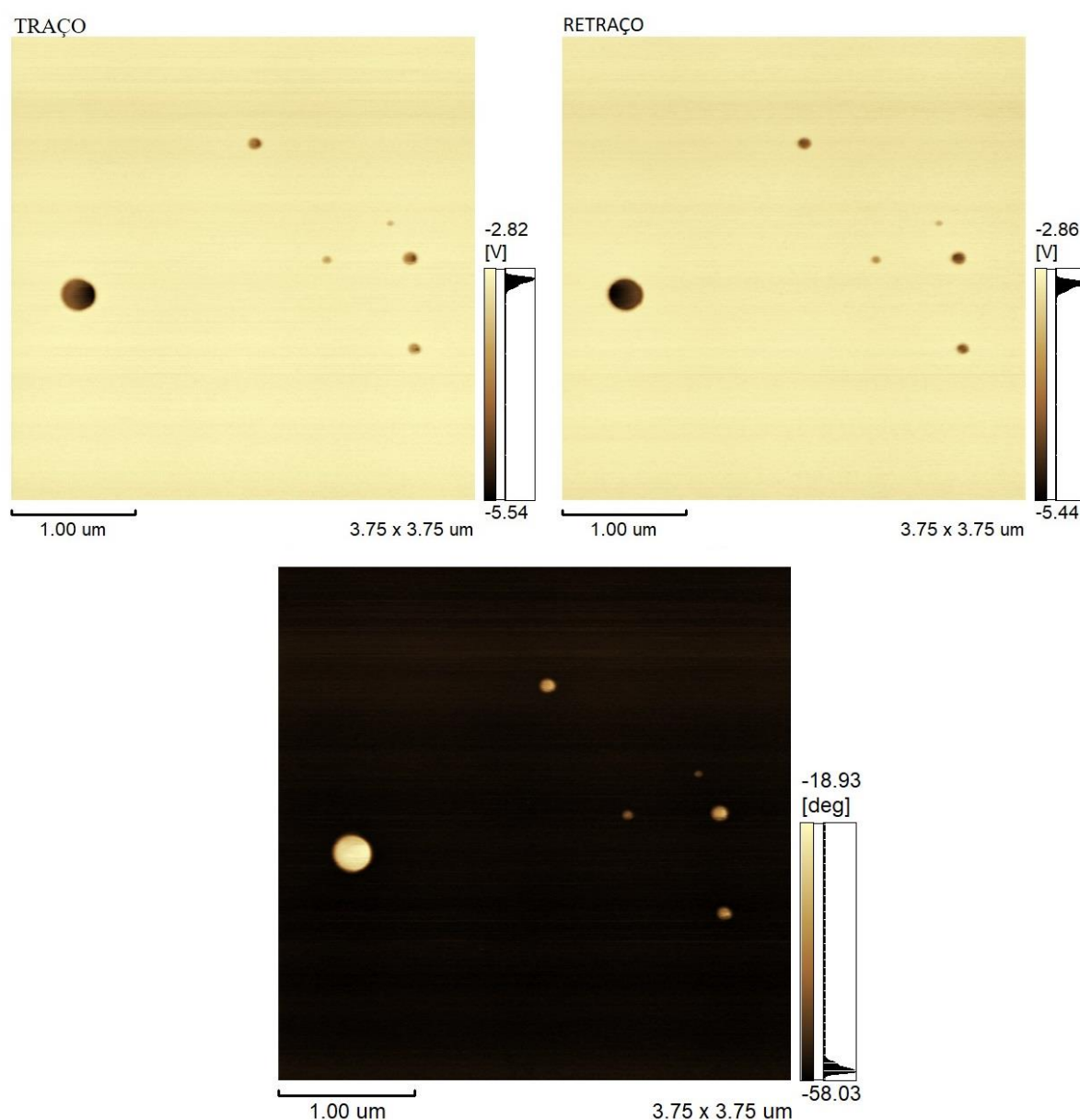
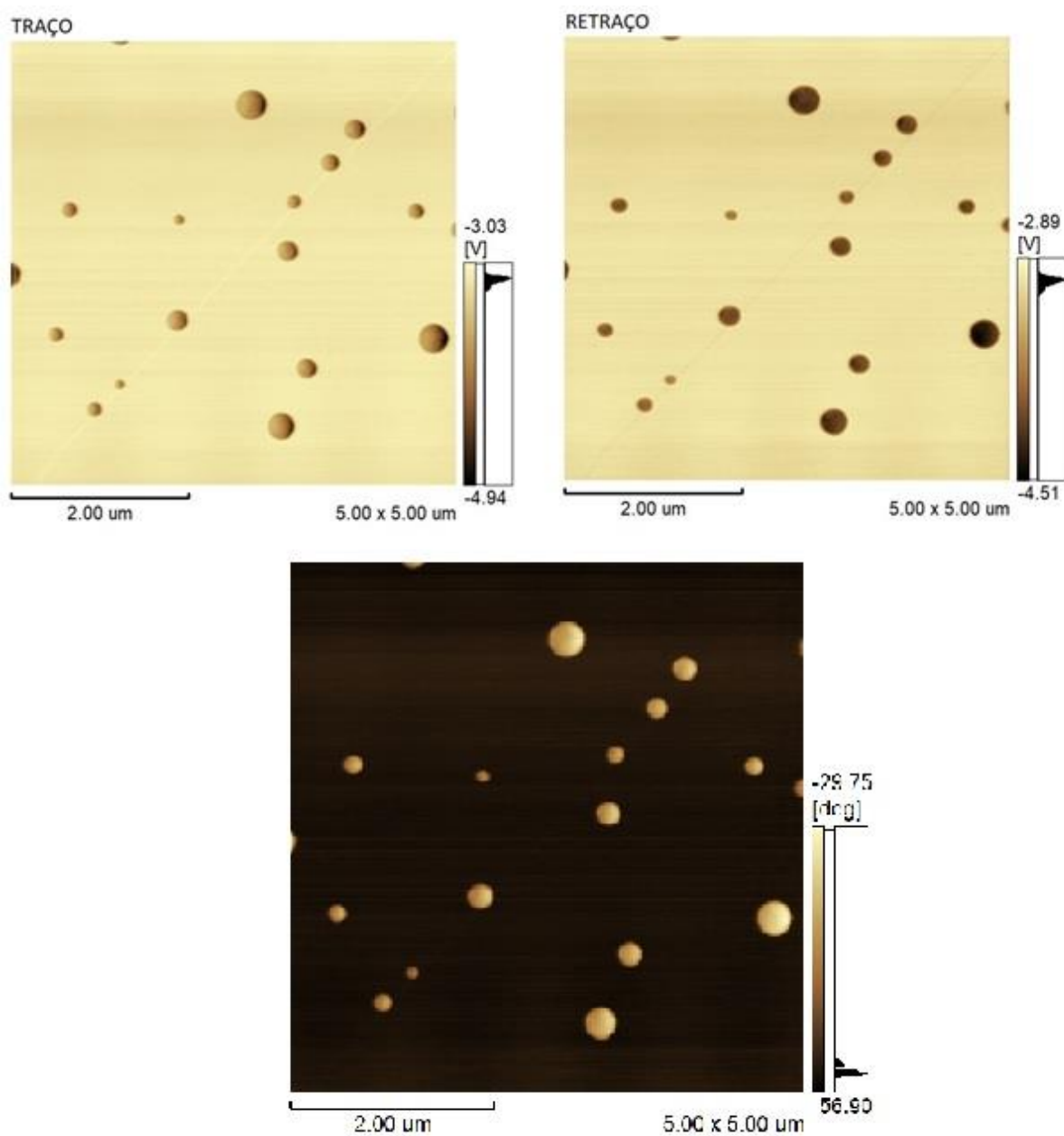


Figura 25 - Fotomicrografia bidimensional das análises de diferença de fase da CV_CLAIPc/NC.



5.2. ESPECTROS DE ABSORÇÃO E EMISSÃO DE FLUORESCÊNCIA NO UV/VIS PARA OS ATIVOS LIVRES E NANOENCAPSULADOS

Foram realizados os estudos de espectroscopia, para avaliar o perfil dos espectros de absorção e emissão do CV em meio orgânico e nanoencapsulado. Os ensaios foram conduzidos utilizando-se a técnica de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-visível, conforme apresentado nas Figuras 26 e 27 respectivamente.

Figura 26 - Espectro de absorção (A) e absorção normalizada (B) no UV/Vis do CV/DMSO e CV/NC, com máximos de absorção em 430 nm e 505 nm para CV/ DMSO e 428 e 503 nm para CV/NC/DMSO.

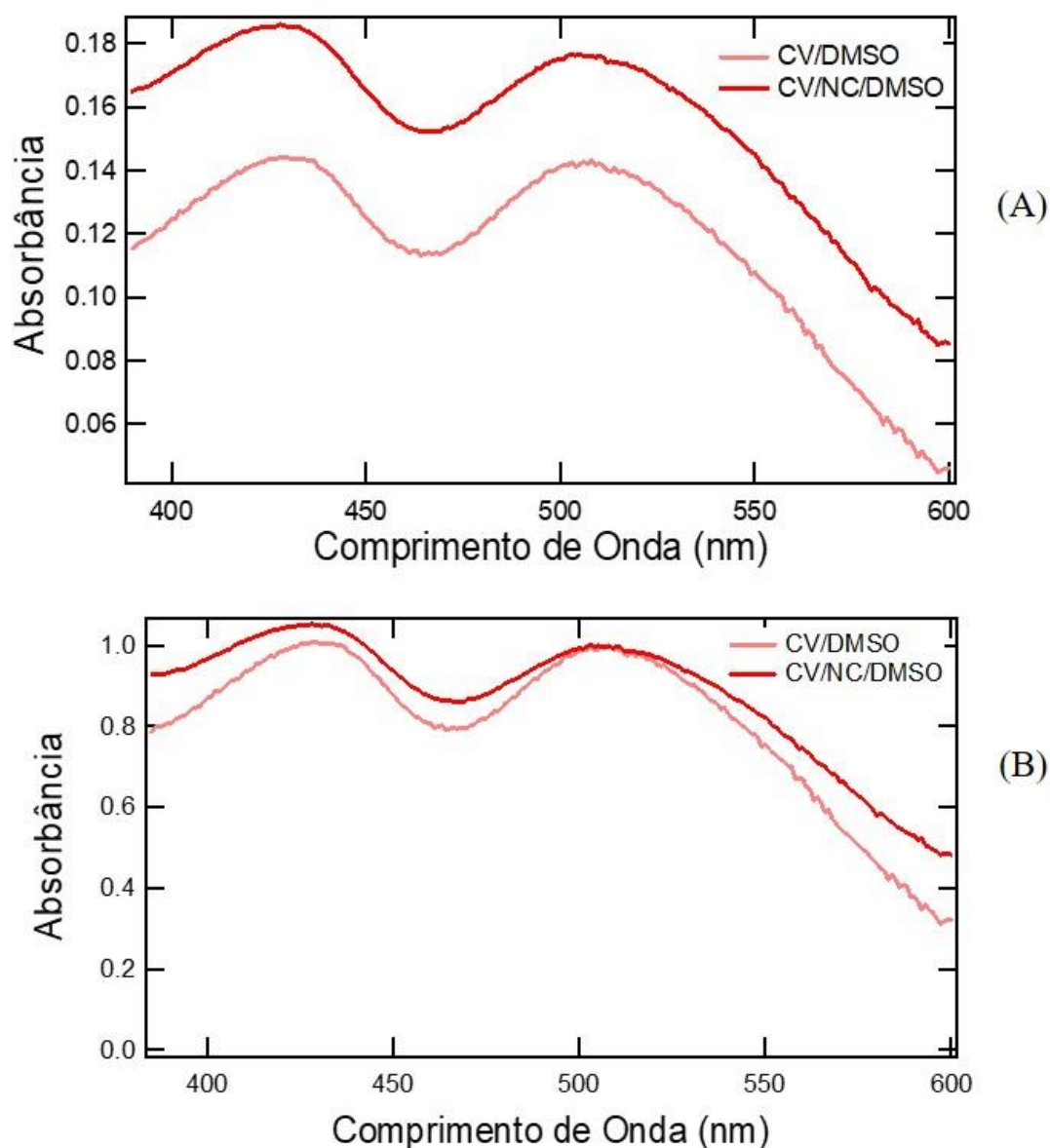
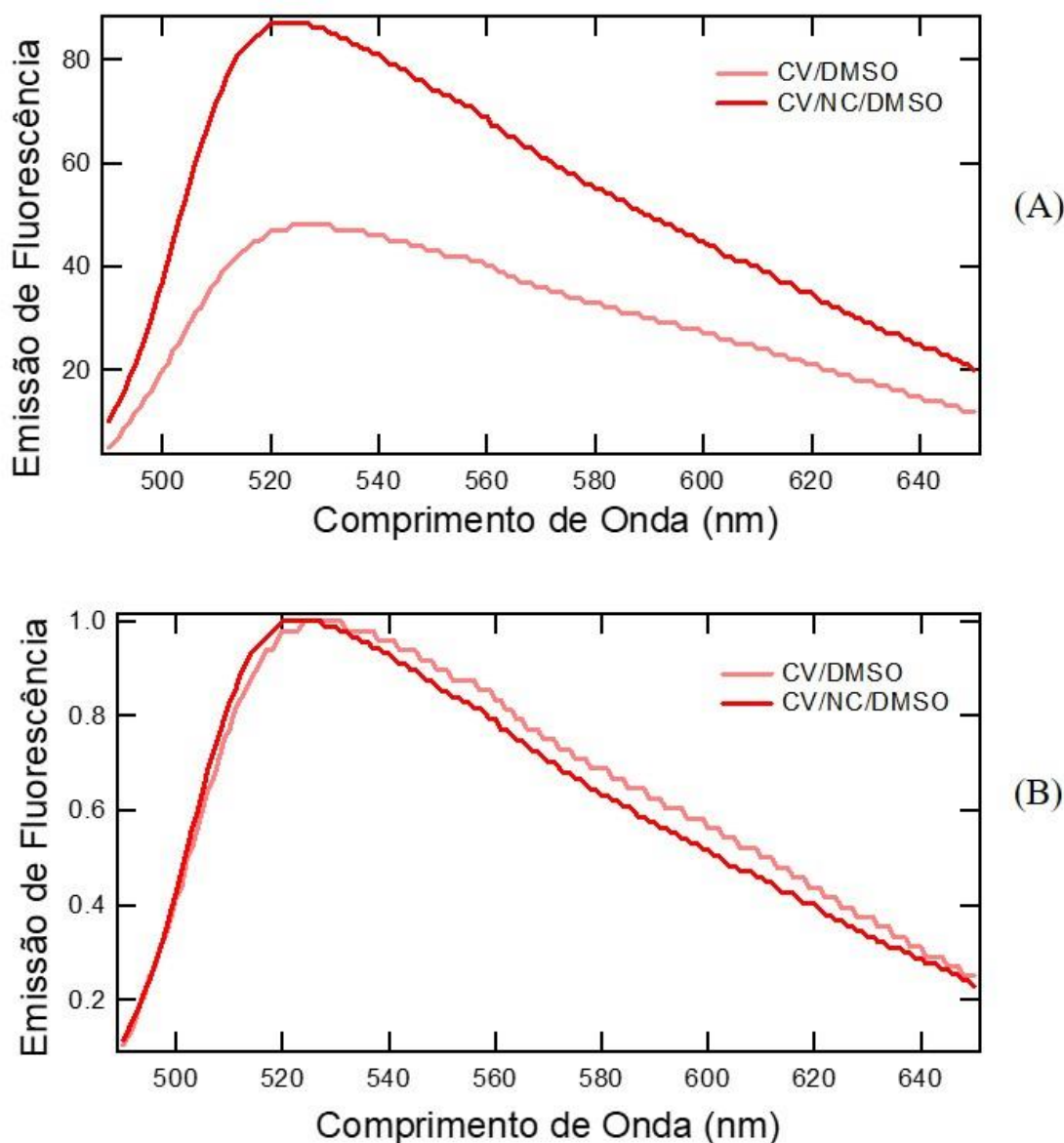


Figura 27 - Espectro de emissão de fluorescência (A) e emissão normalizada (B) no UV-Vis do CV/DMSO e do CV/NC na concentração de 0,1 mg/ml, com comprimento de excitação de 480 nm para ambos, tempo de integração de 0,5 s e fendas de 3,0/3,0 nm para excitação e emissão, respectivamente.

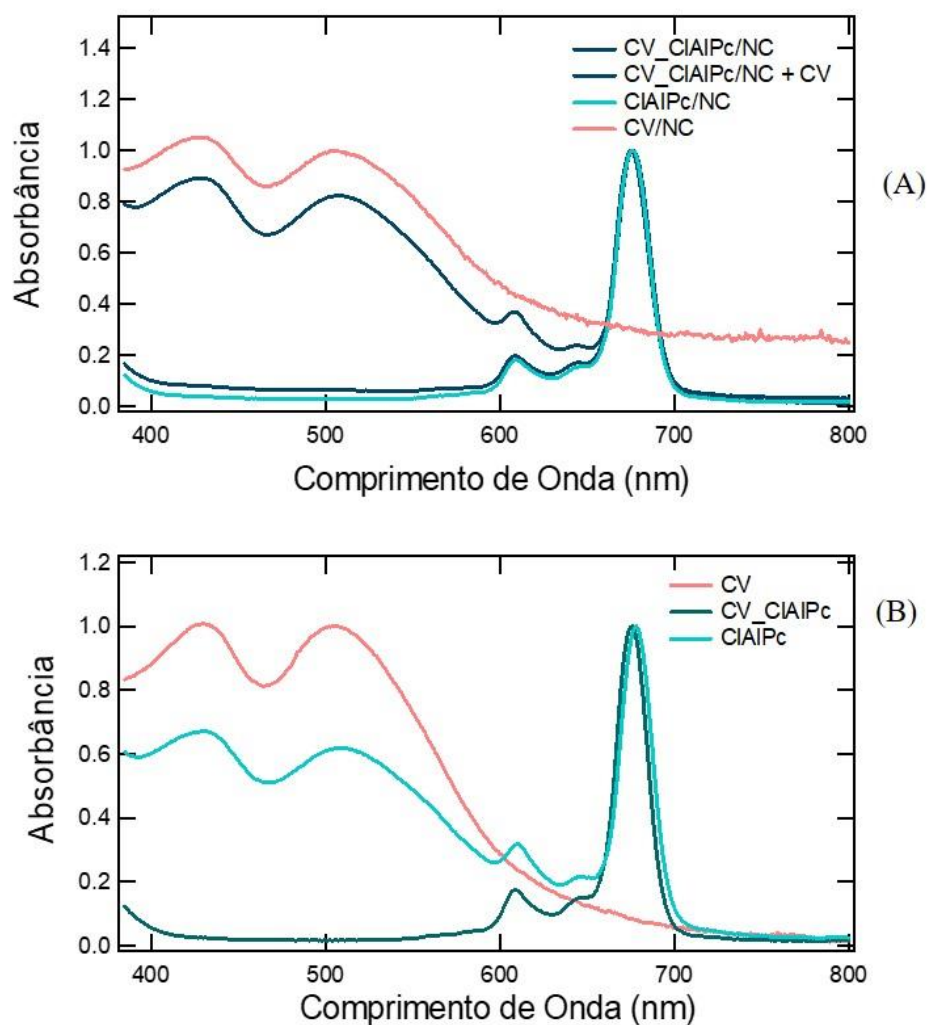


Os resultados apresentados nas Figuras 26 demonstraram ausência de alterações nas propriedades fotofísicas do CV livre em comparação com CV nanoencapsulado, no sentido de manutenção do perfil de absorção máxima em 430 nm e 514 nm para CV/ DMSO e 421 nm e 509 nm para CV/NC. Na Figura 27 temos os espectros de emissão com máximos em 527 nm para o CV/DMSO e 524 nm para CV/NC partindo-se de uma excitação fixa em 480 nm. Estes dados são fundamentais para elucidar o comportamento fotofísico inédito para este composto,

nos diferentes ambientes químicos em estudo. Os resultados confirmam suas características como composto orgânico com alta absortividade na região da cor verde do espectro eletromagnético visível e com espectro de emissão característico para fluoróforos com bom desempenho.

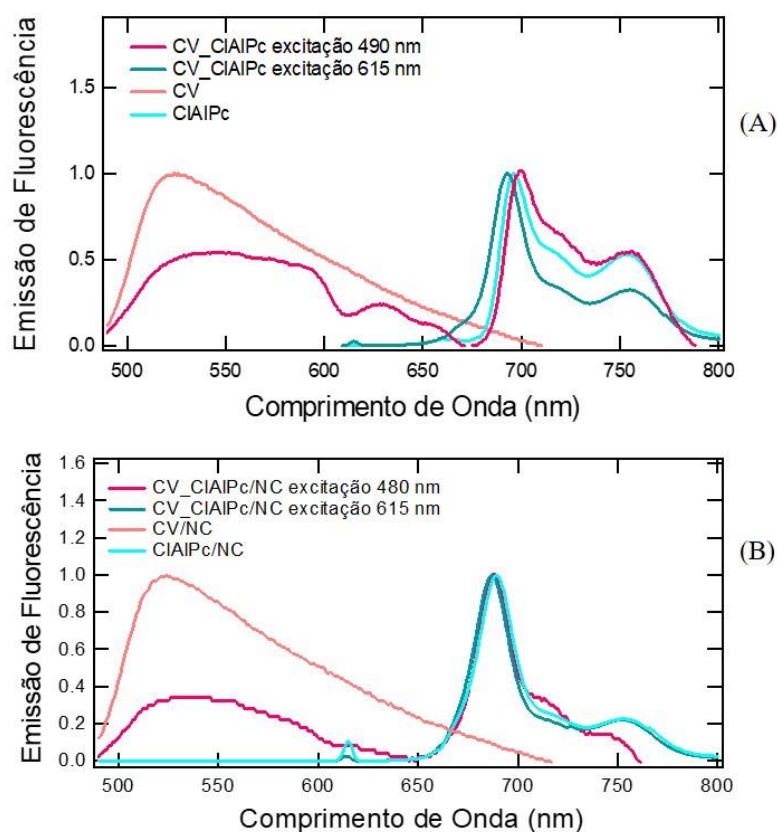
Também foram realizados os estudos de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no estado estacionário para as seguintes amostras: CV_CIAIPc/NC, CIAIPc/NC, CV_CIAIPc/DMSO e CIAIPc/DMSO. Os espectros normalizados estão apresentados na Figura 28.

Figura 28 - Espectro de absorção normalizada no UV/Vis para o (A) CV, CIAIPc e CV+CIAIPc em DMSO e (B) CV/NC, CIAIPc/NC, CV_CIAIPc/NC e CV_CIAIPc/NC + CV em DMSO.



Para as análises de emissão de fluorescência foram utilizados dois comprimentos de onda de excitação, 480 nm na região de excitação do CV e 615 nm na região de excitação da CIAIPc; e varredura de 490 nm a 800 nm para a CV_CIAIPc e somente em 615 nm para CIAIPc/NC, todos os gráficos foram apresentados com suas emissões normalizadas (Figura 29).

Figura 29 - Espectro de emissão de fluorescência normalizada no UV-Vis (A) CV/DMSO com excitação em 480nm, CIAIPc/DMSO com excitação em 615 nm e CV/CIAIPc com excitações em 480 nm e 615nm (B) CV/NC em DMSO com excitação em 480 nm, CIAIPc/NC em DMSO com excitação em 615 nm CV_CIAIPc/NC em DMSO, com comprimentos de onda de excitação de 480 nm e 615 nm, tempo de integração de 0,5 s e fendas de 3,0/3,0 nm para excitação e emissão, respectivamente.

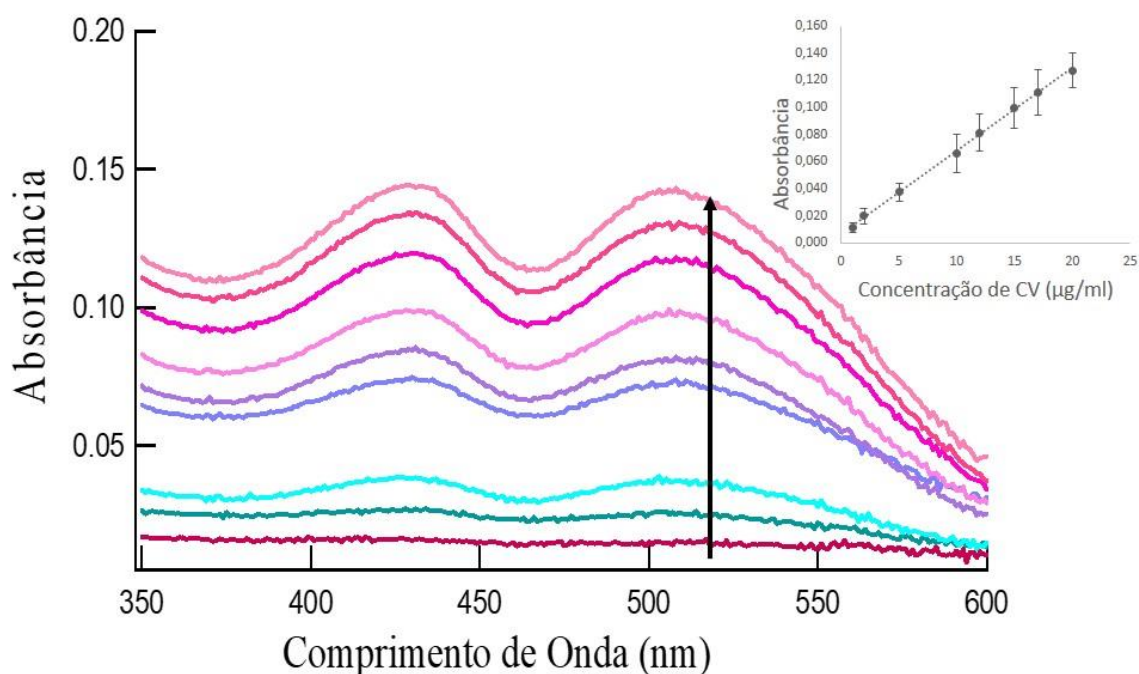


A partir da análise dos espectros é possível afirmar que não houve alteração nos perfis espectrais de absorção e emissão de fluorescência, para nenhum dos ativos, seja em sua forma individual livre ou associados e nanoestruturados.

5.3. CURVA ANALÍTICA: LINEARIDADE DO CORANTE VERMELHO

A partir do método espectroanalítico de absorção no UV/Visível foi possível construir a curva analítica do CV construindo uma curva de correlação entre absorbância do CV em função da concentração molar (Figura 30) e com isso determinar a linearidade do CV.

Figura 30 - Conjuntos de espectros de absorção UV- Vis em solução DMSO em diferentes concentrações (1,0 a 20 µg/ml). Curva de correlação entre a absorção máxima em função da concentração de corante na faixa de 1,0 a 20 µg/ml. $y = 0,0061x + 0,0064$ $R^2 = 0,9991$, $n = 3$.



A linearidade de um analito pode ser definida como a capacidade de obter resultados experimentais de absorção diretamente proporcionais à sua concentração. A partir da curva de correlação ($y = 0,0061x + 0,0064$) foi possível obter um coeficiente de correlação satisfatório (R^2) de 0,9991. A construção da curva de correlação é muito importante pois a partir dela conseguimos quantificar a concentração real do CV associado à nanoestrutura.

A quantificação do CV em NC foi realizada segundo o método descrito na seção 4.6, após determinação da absorbância, foi possível calcular a concentração real de CV associada as NC, obtend-se o valor de 0,07 mg/ml para a amostra de CV/NC e de 0,06 mg/ml para a amostra de CV/ClAlPc. Considerando a concentração teórica de CV em NC igual a 0,1

mg/ml, obtivemos 70% de incorporação de CV na amostra de CV/NC e 60% na amostra de CV_CIAIPc/NC.

Para a quantificação de CIAIPc tanto em na amostra de CIAIPc/NC, quanto em CV_CIAIPc/NC, utilizou-se o método descrito por Siqueira-Moura e colaboradores (2010), e as concentrações reais obtidas foram de 0,03 mg/ml de CIAIPc na amostra de CIAIPc/NC e CV_CIAIPc, a concentração teórica de CIAIPc nas NC era de 0,05 mg/ml, sendo assim, a taxa de associação de CIAIPc foi de 63% nas NC.

Essa diminuição da concentração de ativos pode ser explicada por alguns fatores, sendo eles, perda durante alguma etapa do processo de preparo das formulações, bem como a disputa esperada pela interação com o reservatório oleoso do nanocarreador quando presença de ambos compostos ativos.

5.4. DETERMINAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE ASSOCIAÇÃO DO CV E CIAIPCc NAS NC

A eficiência de encapsulação é definida pela concentração de ativos que foram encapsulados nos nanocarreadores, é considerada um fator muito importante na caracterização dos nanomateriais. A eficiência de encapsulação é calculada por uma relação direta de proporcionalidade, a qual considera a concentração total presente na formulação e a concentração da molécula livre (calculadas pelo método espectroanalítico determinado em 4.4.5), ou seja, não encapsulada nas nanopartículas. Em todas as amostras obteve 100% de encapsulação dos ativos, esses resultados, são também observados nos resultados de MFA, onde é possível observar nas análises de diferença de fases, que não há moléculas de ativos dispersas no meio.

5.5. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE VIDA DE FLUORESCÊNCIA

O tempo de vida de um composto fluorescente (τ_f) representa o tempo médio que esta molécula permanece no estado excitado antes de retornar ao estado fundamental. Assim, medidas de fluorescência resolvida no tempo podem revelar detalhes referentes às interações do fluoróforo com o ambiente químico em que se encontra (GHOSH et al., 2018).

Nas Figuras 31 a 34 temos os decaimentos exponenciais característicos para a contagem de fótons utilizada para obtenção do tempo de vida de fluorescência. Este parâmetro fotofísico foi determinado para o CV e CIAIPc nos diferentes meios em estudo.

Figura 31 - Decaimento de fluorescência do CV/NC e CV/DMSO_ACN, com comprimento de onda de excitação fixado em 470 nm.

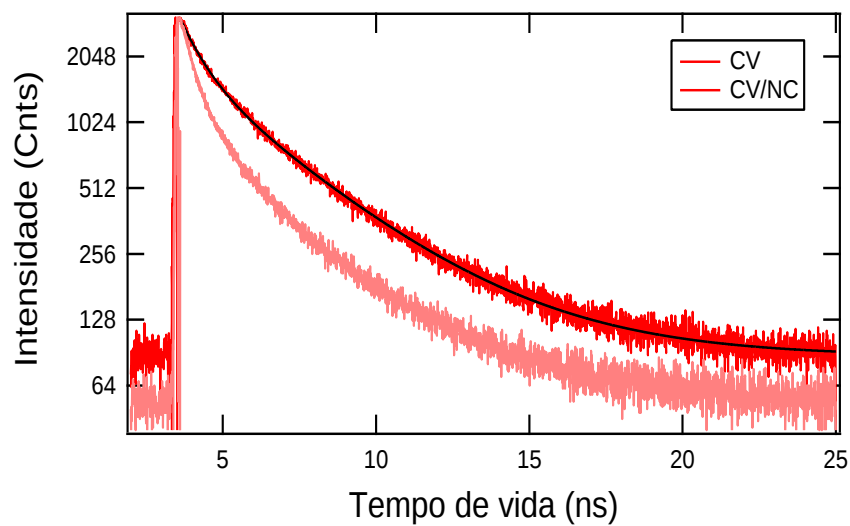


Figura 32 - Decaimento de fluorescência para ClAIPc/DMSO e ClAIPc/NC, com comprimento de onda de excitação fixado em 540 nm.

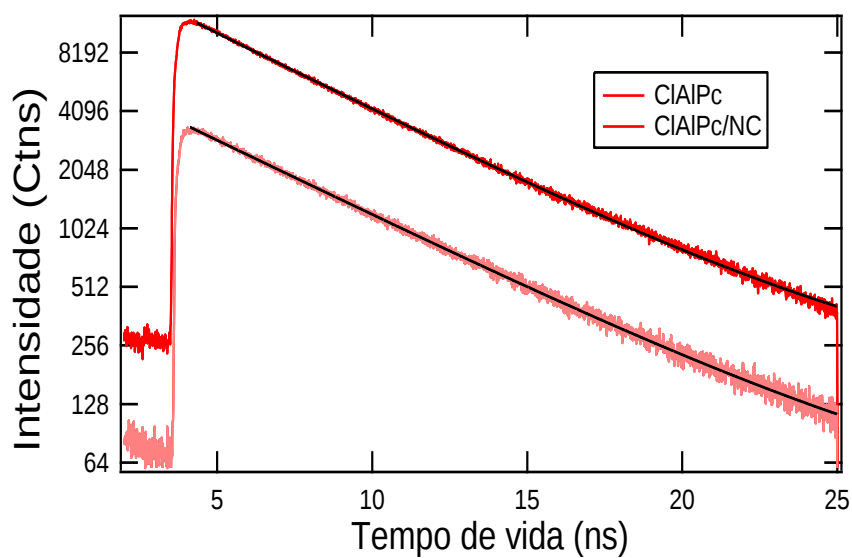


Figura 33 - Decaimento de fluorescência do CV_CIAIPc/ NC, comprimento de onda de excitação de 640 nm.

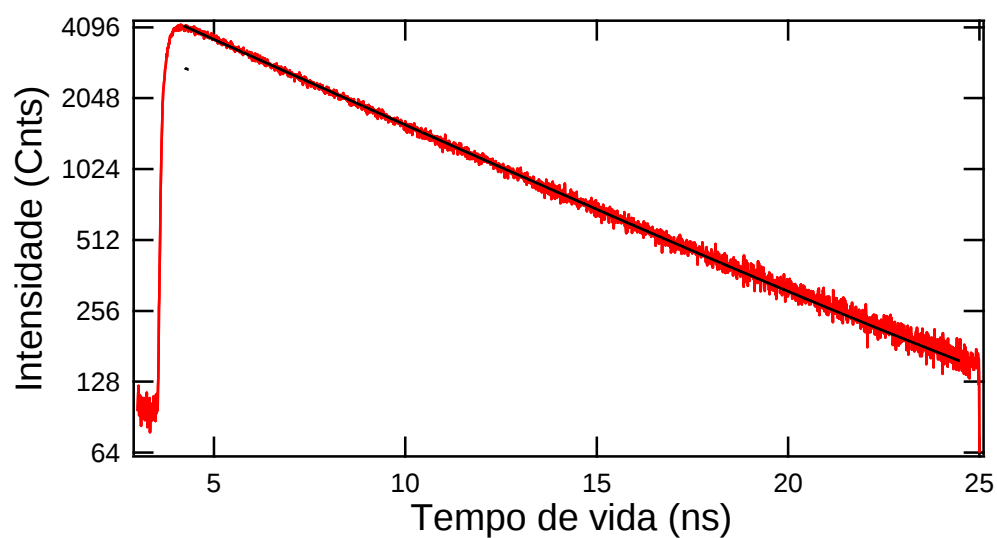
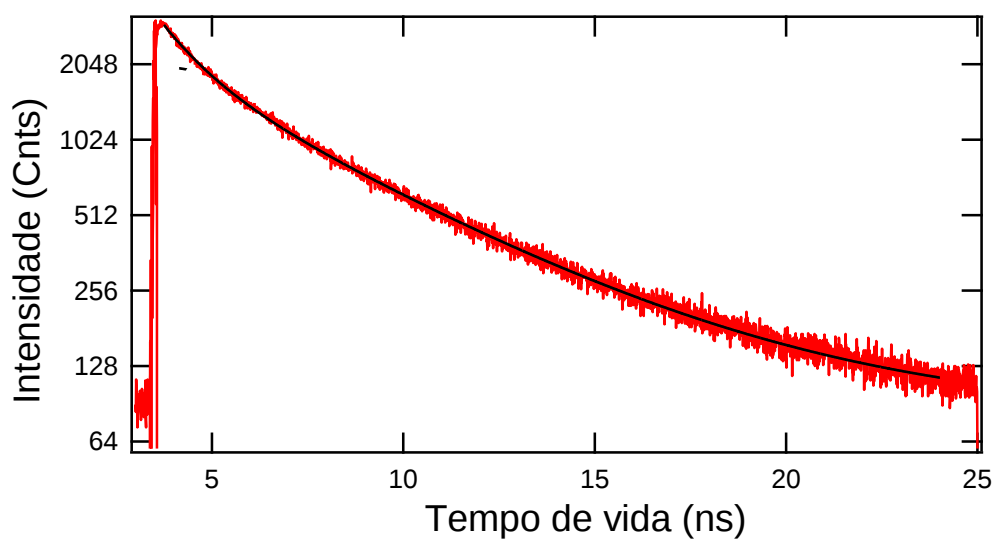


Figura 34 - Decaimento de fluorescência do CV_CIAIPc/NC, comprimento de onda de excitação de 470 nm.



Os parâmetros cinéticos obtidos a partir dos decaimentos de cada amostra se encontram na Tabela 7 a seguir.

Tabela 7 - Tempo de vida de fluorescência (τ) para as amostras estudadas nos diferentes ambientes químicos

Amostras	τ_1 /ns	τ_2 /ns
CV/DMSO_ACN	3,14 (34,9%)	0,57 (65,1%)
CV/NC	3,59 (58,6%)	0,75 (41,5%)
CV_CIAIPc/NC 470 nm	5,04 (64,4%)	1,10 (35,6%)
CV_CIAIPc/NC 640 nm	5,86 (100%)	--
CIAIPc/NC	5,58 (100%)	--
CIAIPc/DMSO	5,44 (100%)	--

O CV/DMSO_ACN e CV/NC mostraram um ajuste bi-exponencial com dois tempos de vida. As análises demonstraram uma população de 65,1% para tempo de 0,57 ns e 34,9% para tempo de 3,14 CV/DMSO_ACN, e populações de 58,6% para tempo de 3,59 ns e 41,5% para tempo de 0,75 ns para CV/NC. A CIAIPc mostrou um ajuste mono-exponencial, tanto livre quanto nanoencapsulado, com tempos de vida de 5,58 ns para CIAIPc/NC e 5,44 ns para CIAIPc/DMSO. A CV/CIAIPc apresentou um ajuste bi-exponencial quando excitado no comprimento de onda de 470 nm e tempos de vida de 5,04 ns com uma população de 64,4% e 1,10 ns com 35,6% e ajuste mono exponencial quando excitado em 640 nm com tempo de vida de 5,86 ns.

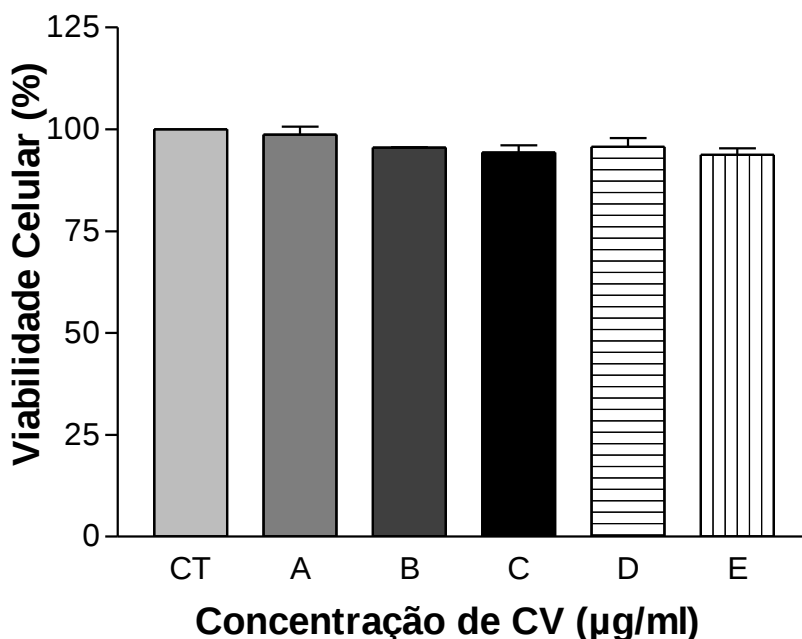
Múltiplos tempos de vidas podem ser explicados pela presença de monômeros, que podem ser formados devido a concentração do ativo, do tipo de solvente em que está dissolvido ou ambientes químicos heterogêneos poliméricos como é o caso das NC (JAYME; CALORI; TEDESCO, 2016). Esse padrão de decaimento poli-exponencial também pode ser causado muitas vezes pela inter-conversão rápida entre estados que possuem tempo de vida mono-exponencial (GHOSH et al., 2018).

Em geral foram tempos de vida curtos para os ativos na forma livre ou nanoestruturados, o que pode indicar que o composto CV deva possuir rendimentos de transferência de energia para processos não radiativos, como os fotodinâmicos.

5.6. ESTUDOS DE CITOTOXICIDADE EM CULTURA CELULAR DE LINHAGEM DE FIBROBLASTOS DE MURINO

O teste de citotoxicidade foi realizado utilizando-se o método de MTT como descrito na seção 4.9. Para o CV livre foram utilizadas concentrações de e 2,5 µg/ml (2,5%), 5,0 µg/ml (5,0%), 15 µg/ml (15%), 25 µg/ml (25%) e 50 µg/ml (50%), sendo o CV solubilizado diretamente no meio DMEM sem suplementação, sendo assim não houve necessidade de se fazer um controle para solvente. Foram realizadas as análises estáticas e os resultados estão apresentados na Figura 35.

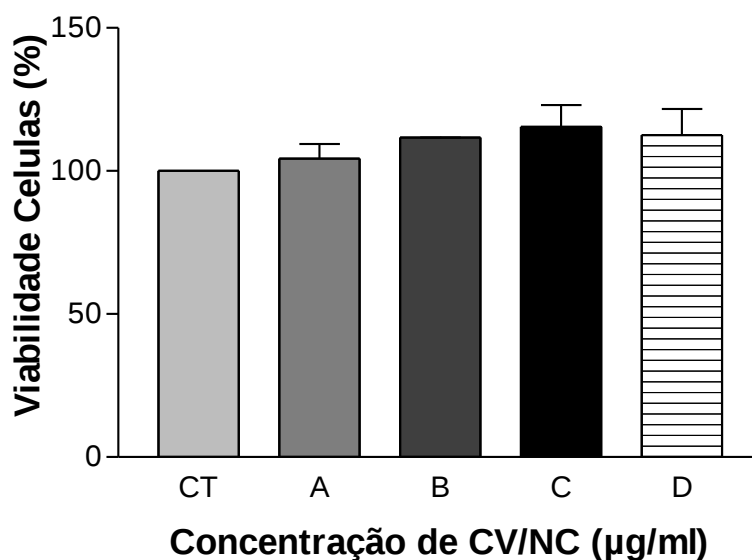
Figura 35 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do CV livre em linhagem NIH/3T3 fibroblastos de murino usando MTT, onde CT= controle somente com DMEM, A = 2,5 µg/ml, B = 5,0 µg/ml, C = 15 µg/ml, D = 25 µg/ml e E = 50 µg/ml. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).



Como indicado na Figura 34, os resultados da análise estatística *One-way* ANOVA, mostram ausência de citotoxicidade para todas as concentrações de CV livre na ausência de luz, sendo que para todas as concentrações avaliadas a viabilidade celular ficou acima de 93%.

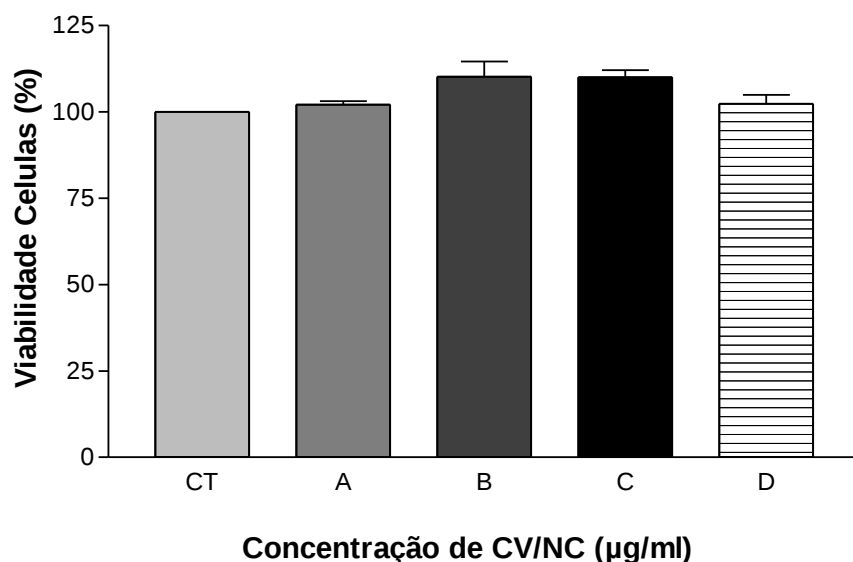
Para o ensaio biológico investigativo para CV/NC, foi utilizando também o método de MTT (seção 4.9) com as concentrações de e 5,0 µg/ml (5%), 15 µg/ml (15%), 25 µg/ml (25%) e 50 µg/ml (50%), e os resultados estão apresentados da Figura 36.

Figura 36 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do CV/NC em linhagem NIH/3T3 fibroblastos de murino usando MTT, onde CT= controle somente com DMEM, A = 5,0 µg/ml, B = 15 µg/ml, C = 25 µg/ml e D = 50 µg/ml. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).



Os resultados da análise estatística *One-way* ANOVA (Figura 35), confirmam ausência de citotoxicidade para todas as concentrações de CV/NC na ausência de luz (viabilidade celular $\geq 100\%$). Devido ao resultado de viabilidade maior que 100%, foi necessário realizar um outro ensaio de citotoxicidade afim de avaliar se houve algum interferente que pudesse influenciar na viabilidade celular, para isso foi utilizado o método da resazurina descrito na seção 4.10 e as mesmas concentrações foram praticadas: 5 µg/ml (5%), 15 µg/ml (15%), 25 µg/ml (25%) e 50 µg/ml (50%) de CV/NC. Foi aplicada a análise estatística *One-way* ANOVA e os resultados foram apresentados na Figura 37.

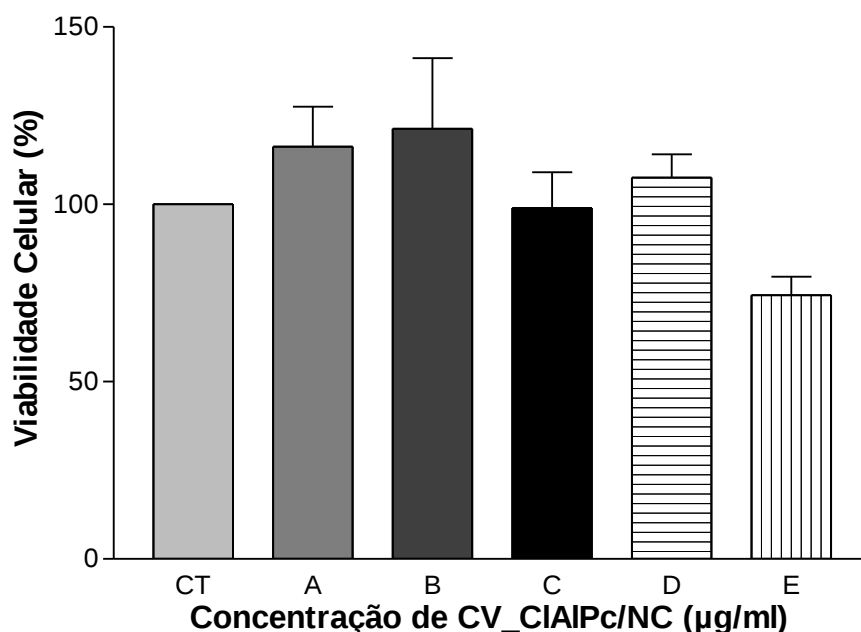
Figura 37 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do CV/NC em linhagem NIH/3T3 fibroblastos de murino usando rezasurina, onde CT= controle somente com DMEM, A = 5,0 µg/ml, B = 15 µg/ml, C= 25 µg/ml e D =50 µg/ml. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way ANOVA* seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (*p<0,05).



Na Figura 37 apresenta os resultados obtidos que confirmaram ausência de citotoxicidade para todas as concentrações de CV/NC com viabilidade celular acima de 98%.

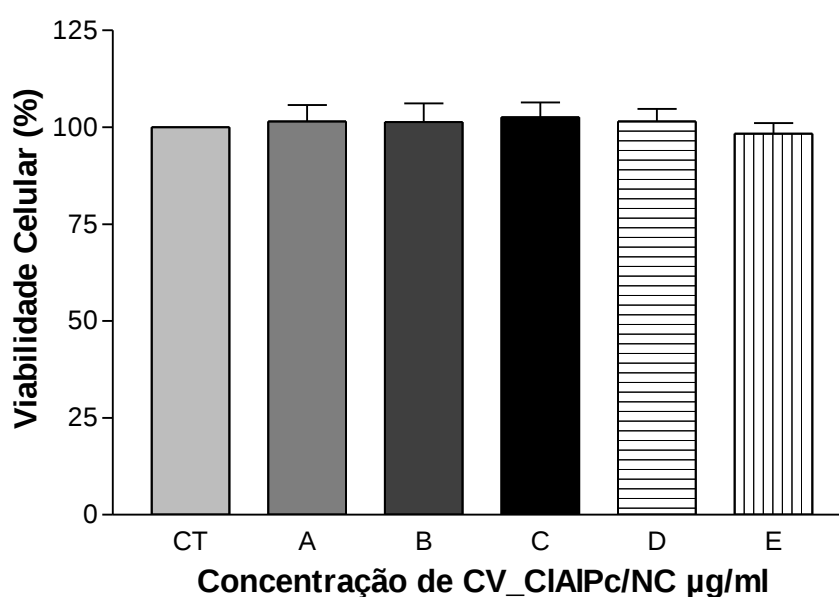
Para a formulação CV_CIAIPc/NC foi utilizado também o método de MTT (seção 4.9) com as concentrações de 2,5 µg/ml e 12 µg/ml (2,5%), 5,0 µg/ml e 25 µg/ml (5%), 15 µg/ml e 25 µg/ml (15%), 25 µg/ml e 75 µg/ml (25%) e 50 µg/ml e 250 µg/ml (50%) de CV e CIAIPc respectivamente. Os resultados estão apresentados da Figura 38.

Figura 38 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do CV/NC em linhagem NIH/3T3 fibroblastos de murino usando MTT, onde CT= controle somente com DMEM, A = 2,5 µg/ml e 12 µg/ml (2,5%), B = 5,0 µg/ml e 25 µg/ml (5%), C = 15 µg/ml e 25 µg/ml (15%), D = 25 µg/ml e 75 µg/ml (25%) E = 50 µg/ml e 250 µg/ml (50%). A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (*p<0,05).



O resultado das análises estatísticas confirmou uma ausência de citotoxicidade (sem diferenças estatísticas) para A, B, C e D, no entanto para as maiores concentrações (E) a viabilidade foi de 74% o que sugere uma citotoxicidade, além de flutuações nos valores de viabilidade acima de 100%, assim para confirmar esse resultado, foi realizado outro ensaio biológico utilizando um método adicional de viabilidade celular, baseado na utilização da resazurina (seção 4.10), utilizando as concentrações de CV_CIAIPc/NC 5,0 µg/ml e 25 µg/ml (5%), 15 µg/ml e 25 µg/ml (15%), 25 µg/ml e 75 µg/ml (25%) e 50 µg/ml e 250 µg/ml (50%) de CV e CIAIPc, e utilizando um conjunto de 16 poços com 50% de Vazia/NC como controle positivo. Os resultados estão apresentados na Figura 39.

Figura 39 - Ensaio *in vitro* de citotoxicidade do CV/NC em linhagem NIH/3T3 fibroblastos de murinho usando rezasurina, onde CT = controle somente com DMEM, A = 5,0 µg/ml e 25 µg/ml (5%), B = 15 µg/ml e 25 µg/ml (15%), C= 25 µg/ml e 75 µg/ml (25%) e D = 50 µg/ml e 250 µg/ml (50%) E = 50% de Vazia/NC. A significância estatística foi determinada pelo teste de análise de variância *One-way* ANOVA seguido do pós-teste *Tukey t-test* para múltiplas comparações (* $p < 0,05$).



Conforme apresentado na Figura 39 observamos que a análise estatística do teste com rezasurina mostrou ausência de citotoxicidade para todas as concentrações, inclusive para NC sem ativo (Vazia/NC). Os resultados obtidos em todos ao teste concluem que tanto o CV livre quanto nanoestruturado apresentam biocompatibilidade adequada e podem ser usados em protocolos com aplicação biológica e ensaios subsequentes futuros para avaliação de atividade fotodinâmica em modelos *in vitro* e *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

A partir dos dados obtidos podemos concluir que foi possível desenvolver uma formulação polimérica, contendo CV e CIAIPc individualizados ou associados utilizando-se como nanoestrutura carreadora as NC, as quais apresentaram tamanho de partícula submicrônico $< 250\text{nm}$, $\text{PdI} < 0,3$ e carga residual predominantemente negativa, além disso se mantiveram estáveis durante o período de acompanhamento de 3 meses quando armazenada a 7°C ; a estabilidade acelerada também mostrou uma estabilidade de 3 meses

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

REFERÊNCIAS

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

- DERAKHSHANDEH, K.; ERFAN, M.; DADASHZADEH, S. Encapsulation of 9-nitrocamptothecin, a novel anticancer drug, in biodegradable nanoparticles: factorial design, characterization and release kinetics. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 1, p. 34-41, 2007.
- DIMMER, J. A.; MONTOYA, S. C. N.; MENDOZA, C. S.; CABRERA, J. L. Photosensitizing anthraquinones from *Heterophyllaea lycioides* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 137, p. 94-100, 2017.
- DONSI, F.; FERRARI, G. Essential oil nanoemulsions as antimicrobial agents in food. **Journal of Biotechnology**, v. 233, p. 106-120, 2016.
- DOS SANTOS, P. P.; FLORES, S. H.; DE OLIVEIRA RIOS, A.; CHISTE, R. C. Biodegradable polymers as wall materials to the synthesis of bioactive compound nanocapsules. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 23-33, 2016.
- DUVAL, J.; PECHER, V.; POUJOL, M.; LESELLIER, E. Research advances for the extraction, analysis and uses of anthraquinones: a review. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 812-833, 2016.
- FALLOUH, N. A. K.; ROBLOT-TREUPEL, L.; FESSI, H.; DEVISSAGUET, J. P.; PUISIEUX, F. Development of a new process for the manufacture of polyisobutylcyanoacrylate nanocapsules. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 28, n. 2-3, p. 125-132, 1986.
- FESSI, H. P. F. D.; PUISIEUX, F.; DEVISSAGUET, J. P.; AMMOURY, N.; BENITA, S. Nanocapsule formation by interfacial polymer deposition following solvent displacement. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 55, n. 1, p. R1-R4, 1989.
- FOOTE, C. S. Definition of type I and type II photosensitized oxidation. **Photochemistry and photobiology**, v. 54, n. 5, p. 659-659, 1991.
- FRESHNEY, R. I. The culture environment: substrate, gas phase, medium and temperature. In: FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique**. 3rd ed. New York: Wiley-Liss, 1994. p. 71.
- GAO, Shegan et al. Specific cellular accumulation of photofrin-II in EC cells promotes photodynamic treatment efficacy in esophageal cancer. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 14, p. 27-33, 2016.
- GHOSH, A.; JOSE, D.; KAUSHIK, R. Anthraquinones as versatile colorimetric reagent for anions. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 229, p. 545-560, 2016.
- GHOSH, A.; KAREDLA, N.; THIELE, J. C.; GREGOR, I.; ENDERLEIN, J. Fluorescence Lifetime Correlation Spectroscopy: Basics and Applications. **Methods**, v. 140, p. 32-39, 2018.
- GOYAL, G.; HWANG, J.; AVIRAL, J.; SEO, Y.; JO, Y.; SON, J.; CHOI, J. Green synthesis of silver nanoparticles using β -glucan, and their incorporation into doxorubicin-loaded water-in-oil nanoemulsions for antitumor and antibacterial applications. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 47, p. 179-186, 2017.
- GUPTA, V. K.; TUOHY, M. G.; O'DONOVAN, A.; LOHANI, M. (Ed.). **Biotechnology of bioactive compounds: sources and applications**. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2015.

GUTIÉRREZ, L.; STEPIEN, G.; GUTIÉRREZ, L.; PÉREZ-HERNÁNDEZ, M.; PARDO, J.; PARDO, J.; GRAZU, V.; DE LA FUENTE, J. M. Nanotechnology in Drug Discovery and Development. In: CHACKALAMANNIL, S.; ROTELLA, D.; SIMON WARD, S. (Ed.). **Comprehensive Medicinal Chemistry III**. 3rd. ed. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier, 2017. P. 264–295.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

- SINGH, A. **Herbal Drugs as Therapeutic Agents**. Boca Raton, FL.: CRC Press, 2014.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1744-1752, 2013.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Die Pharmazie-An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 1, p. 9-14, 2010.
- SOUISSI, M.; GUESMI, A.; MOUSSA, A. Valorization of natural dye extracted from date palm pits (*Phoenix dactylifera*) for dyeing of cotton fabric. Part 2: Optimization of dyeing process and improvement of colorfastness with biological mordants. **Journal of Cleaner Production**, v. 204, p. 1143-1153, 2018.
- TANG, Z.; HE, C.; TIAN, H.; DING, J.; HSIAO, B. S.; CHU, B.; CHEN, X. Polymeric nanostructured materials for biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 60, p. 86-128, 2016.
- TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; DE JESUS, P. da C. C. Antimicrobial Photodynamic Therapy (APDT) Action Based on Nanostructured Photosensitizers. In: GRUMEZESCU, A. M. (editor). **Multifunctional Systems for Combined Delivery, Biosensing and Diagnostics**. Amsterdam, Netherlands: Elsevier, 2017. p. 9-29.
- THAKKAR, H. P.; KHUNT, A.; DHANDE, R. D.; PATEL, A. A. Formulation and evaluation of Itraconazole nanoemulsion for enhanced oral bioavailability. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 6, p. 559-569, 2015.
- THOMAS, L.; ZAKIR, F.; MIRZA, M. A.; ANWER, M. K.; AHMAD, F. J.; IQBAL, Z. Development of Curcumin loaded chitosan polymer based nanoemulsion gel: In vitro, ex vivo evaluation and in vivo wound healing studies. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 101, p. 569-579, 2017.
- TREUEL, L.; BRANDHOLT, S.; MAFFRE, P.; WIEGELE, S.; SHANG, L.; NIENHAUS, G. U. Impact of protein modification on the protein corona on nanoparticles and nanoparticle–cell interactions. **ACS nano**, v. 8, n. 1, p. 503-513, 2014.
- UNSAL, H.; AYDOGAN, N. Formation of chiral nanotubes by the novel anthraquinone containing-achiral molecule. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 394, p. 301-311, 2013.
- VELHO, S. R.; BRUM, L. F.; PETTER, C. O.; DOS SANTOS, J. H. Z.; ŠIMUNIĆ, Š.; KAPPA, W. H. Development of structured natural dyes for use into plastics. **Dyes and Pigments**, v. 136, p. 248-254, 2017.
- VENDITTI, I. Morphologies and functionalities of polymeric nanocarriers as chemical tools for drug delivery: a review. **Journal of King Saud University-Science**, 2017. In Press. Doi: <<https://doi.org/10.1016/j.jksus.2017.10.004>> .
- ZHANG, J.; JIANG, C.; LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; ZHANG, H.; MUEHLMANN, L. A. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 137-146, 2018.

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