



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIODIVERSIDADE E
BIOTECNOLOGIA - REDE BIONORTE**

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA COM
THEOBROMA GRANDIFLORUM COMO POTENCIAL
FOTOSENSIBILIZANTE**

ANDERSON LUIS RAMOS

Rio Branco - AC

2023

ANDERSON LUIS RAMOS

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA COM
THEOBROMA GRANDIFLORUM COMO POTENCIAL
FOTOSENSIBILIZANTE**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação e Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Acre, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Anselmo
Fortunato Ruiz Rodriguez

Coorientador: Prof. Dr. Fernando
Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria

Rio Branco – AC

2023

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da UFAC

R175s Ramos, Anderson Luis, 1982 -

Síntese de nanopartícula lipídica sólida com *theobroma grandiflorum* como potencial fotossensibilizante / Anderson Luis Ramos; orientador: Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez e coorientador: Prof. Dr. Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria. – 2023.

111 f.: il.; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Acre, Programa de Pós Graduação em Rede de Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, Rio Branco, 2023.

Inclui referências bibliográficas e anexos.

1. Nanopartículas Lipídicas Sólidas - NLS. 2. Extrato de plantas. 3. Citotoxicidade. I. Rodriguez, Anselmo Fortunato Ruiz. (orientador). II. Faria, Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de. (coorientador). III. Título.

CDD: 660

Bibliotecário: Uéliton Nascimento Torres CRB-11º/1074.

ANDERSON LUIS RAMOS

**SÍNTESE DE NANOPARTÍCULA LIPÍDICA SÓLIDA COM
THEOBROMA GRANDIFLORUM COMO POTENCIAL
FOTOSENSIBILIZANTE**

Tese de doutorado apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede BIONORTE, na Universidade Federal do Acre, como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Biodiversidade e Biotecnologia.

Aprovada em / /



Banca examinadora

Prof. Dr. Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez (Orientador)

Universidade Federal do Acre



Prof. Dr. Antonio Alves de Melo Filho
Universidade Federal de Roraima
Departamento de Química
Professor Titular

Prof. Dr. Antonio Alves de Melo Filho

Universidade Federal de Roraima



Prof. Dr. Antonio Romero da Costa Pinheiro

Universidade Federal do Acre



Prof. Dr. Luis Eduardo Maggi

Universidade Federal do Acre



Prof. Dr. Roberto Nicolete

Fiocruz – Ceará

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, amada esposa Karoline Braga, minhas filhas Gabrielle Ramos e Beatriz Ramos por me apoiarem e fazerem melhores os meus dias.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Professor Doutor Anselmo F. Ruiz Rodriguez pela oportunidade de aprender mais em decorrência da elaboração desta tese; e ao meu coorientador Professor Doutor Fernando S. Escócio pelo auxílio e encorajamento científico. Gostaria de agradecer ao professor Doutor Dr. Orlando Ferreira Cruz Jr. e ao técnico Msc. Leonardo Cavalcante de Queiroz do Laboratório Temático de Microscopia e Nanotecnologia do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, pela disponibilidade e solicitude em ajudar com as análises. Gostaria de agradecer ao Professor Dr. Emerson Silva Lima e sua equipe da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, pela fundamental colaboração com este trabalho. Agradeço aos colegas do PPG Bionorte pela ajuda durante este tempo de trabalho e estudo, e por compartilharem com alegria o ensejo acadêmico e científico.

RESUMO

Neste trabalho preparamos nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) a base da manteiga de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) para o carregamento do extrato aquoso da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) e camu-camu (*Myrciaria florinda*). As NLS foram obtidas pela técnica de cisalhamento, ultrassom e caracterizadas pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), termogravimetria (TG-DSC) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As propriedades espectroscópicas das formulações e dos extratos foram avaliadas por UV-Vis e espectroscopia Molecular de Fluorescência. A fotoatividade foi verificada pela decomposição do 1, 3-difenil-isobenzofurano (DPBF) e diodo emissor de luz - LED azul. As NLS apresentaram um raio hidrodinâmico médio de 116,2, 119,8 e 113,7 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,172, 0,184, e 0,194, o potencial Zeta de -30,05, -35,2 e -32 mV respectivamente. As imagens de MEV confirmam a morfologia esférica das NLS obtidas. As formulações apresentaram eventos térmicos com absorção do calor (endotérmicos) de decomposição de massa em torno de 300 °C. As formulações não apresentaram citotoxicidade nas células de fibroblastos testadas em 72 h. Na avaliação da fluorescência molecular foi observado que as formulações NLS-BR, NLS-AÇ e NLS-CA apresentaram um pico máximo em 687,5 nm quando excitado em 460 nm. No teste de decomposição do DPBF ficou evidente a captura de oxigênio *singlete* pelo rebaixamento da absorbância em 416 nm. Na avaliação das formulações para fotoinativação microbiana para *Candida albicans*, não foi significativa a inibição do microrganismo. Verificou-se que a aplicação de NLS pode ser viável para a aplicação na entrega de compostos hidrossolúveis passíveis de ativação pela luz mostrando grande potencial para ser um fotossensibilizador para aplicação na terapia fotodinâmica.

Palavras-chave: Nanopartículas Lipídicas Sólidas - NLS; Extrato de plantas; Citotoxicidade; Fotoatividade.

ABSTRACT

In this work we prepared solid lipidic nanoparticles (SLN) based on Cupuaçu butter (*Theobroma grandiflorum*) to carry aqueous extract of açaí (*Euterpe oleracea*) and camu-camu (*Myrciaria florinda*) pulp. The NLS were obtained by shear and ultrasonic technique and characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), thermogravimetry TG-DSC and scanning electron microscopy SEM. The spectroscopic properties of the formulations and extracts were evaluated by UV-Vis and spectrofluorescence. The photoactivity was verified by 1, 3-diphenylisobenzofuran (DPBF) decomposition and light emitting diode - blue LED. The obtained NLS showed an average hydrodynamic diameter of 116.2, 119.8 and 113.7 nm, polydispersity index (PDI) of 0.172, 0.184, and 0.194, the Zeta potential of -30.05, -35.2 and -32 mV respectively. SEM images confirm the spherical shape of obtained NLS. The formulations showed endothermic thermal events of mass decomposition around 300 °C. The formulations showed no cytotoxicity on fibroblast cells tested at 72 h. In the molecular fluorescence evaluation it was observed that NLS-BR, NLS-AÇ and NLS-CA formulations showed a maximum peak at 687.5 nm when excited at 460 nm. In the DPBF decomposition test it was evident the capture of singlet oxygen by the decrease of the absorbance at 416 nm. In the evaluation of the formulations for microbial photoinactivation for *Candida albicans*, the inhibition of the microorganism was not significant. It was found that the application of NLS may be feasible for the delivery of light-activatable water-soluble compounds.

Key word: Solid Lipidic Nanoparticles (SLN); Plant extracts; Cytotoxicity; Photoactivity

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. ARRANJO DA MATRIZ LIPÍDICA DE NLS E NLE.	19
FIGURA 2. NANOPLATAFORMAS PARA USO EM TFD.	25
FIGURA 3. DIAGRAMA DE JABLONSKI. MODIFICADO DE.	28
FIGURA 4. HEMATOPORFIRINA E DERIVADOS.	32
FIGURA 5. HOMOGENEIZADOR TIPO ROTOR-ESTATOR E SONICADOR	42
FIGURA 6. IRRADIAÇÃO POR LED AZUL DAS PLACAS CRESCIDAS COM <i>CANDIA ALBICANS</i>	46
FIGURA 7. TAMANHO MÉDIO DE $116,2 \pm 1,27$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-BR.....	47
FIGURA 8. TAMANHO MÉDIO DE $108,1 \pm 1,05$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-AÇ.....	47
FIGURA 9. TAMANHO MÉDIO DE $103,7 \pm 1,23$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-PEG.....	48
FIGURA 10. TAMANHO MÉDIO DE $122,9 \pm 1,47$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-PEG-AÇ... ..	48
FIGURA 11. VALORES DE POTENCIAL ZETA PARA AS FORMULAÇÕES A) NLS-PEG – 32,8 mV, B) NLS-PEG-AÇAÍ – 35,1 mV, C) NLS-AÇAÍ – 33,9 mV, D) NLS- BRANCO – 34,6 mV. .	49
FIGURA 12. TAMANHO MÉDIO E DESVIO PADRÃO DE $112,83 \pm 1,23$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-BR-COP.....	49
FIGURA 13. TAMANHO MÉDIO DE $120,2 \pm 1,95$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-COP.	50
FIGURA 14. TAMANHO MÉDIO DE $116,4 \pm 1,54$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-PEG.....	50
FIGURA 15. TAMANHO MÉDIO DE $115,1 \pm 1,51$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-PEG-COP.	51
FIGURA 16. VALORES DE POTENCIAL ZETA PARA AS FORMULAÇÕES A) NLS-BR – 42,3mV, B) NLS-PEG – 35,9mV, C) NLS-COP – 32,9 mV, D) NLS- PEG-COP – 37,4mV.....	51
FIGURA 17. TAMANHO MÉDIO DE $115,1 \pm 1,41$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-BR.....	52
FIGURA 18. TAMANHO MÉDIO DE $115,1 \pm 1,31$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-CAMU.	52
FIGURA 19. TAMANHO MÉDIO DE $117,5 \pm 1,81$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-PEG.	53
FIGURA 20. TAMANHO MÉDIO DE $115,6 \pm 1,54$ NM OBTIDO NA FORMULAÇÃO NLS-PEG.....	53
FIGURA 21. VALORES DE POTENCIAL ZETA PARA AS FORMULAÇÕES DE CAMU-CAMU A) NLS-BR -36 mV, B) NLS-PEG – 34,1 mV, C) NLS-CAMU -32,3 mV, D) NLS- PEG-CAMU – 35,8 Mv.	54
FIGURA 22. TAMANHO MÉDIO DAS FORMULAÇÕES SEM (-) E COM (+) ADIÇÃO DE POLIETILENOGLICOL PEG. * INDICA DIFERENÇA SIGNIFICATIVA PELO TESTE T ($P < 0,05$)... ..	55
FIGURA 23. ÍNDICE DE POLIDISPERSIVIDADE (PDI) MÉDIO DAS FORMULAÇÕES SEM (-) E COM (+) ADIÇÃO DE POLIETILENOGLICOL PEG.....	56
FIGURA 24. POTENCIAL ZETA MÉDIO PARA AS FORMULAÇÕES NLS-CUR, NLS-AÇAÍ E NLS- BR EM FUNÇÃO DO TEMPO DE ARMAZENAMENTO.....	57

FIGURA 25. ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA PARA AS FORMULAÇÕES NLS-PEG, NLS-PEG-AÇAÍ, NLS-AÇAÍ, NLS- BR.....	57
FIGURA 26. ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA EM MEIO AQUOSO DO EXTRATO DE CAMU-CAMU, POLPA DO AÇAÍ E EXTRATO DE COPAÍBA.	58
FIGURA 27. ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA EM MEIO AQUOSO DO EXTRATO DA POLPA DO AÇAÍ (A), EXTRATO DE COPAÍBA (B) E EXTRATO DE CAMU-CAMU (C).	60
FIGURA 28. ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DAS FORMULAÇÕES NLS (A) AÇAÍ , (B) NLS COP E (C) NLS CAMU.....	61
FIGURA 29. IRRADIAÇÃO DAS AMOSTRAS COM LED AZUL EM 470 NM E LED VERMELHO EM 624 NM.	62
FIGURA 30. IRRADIAÇÃO DA AMOSTRA NLS-BR COM LED VERMELHO EM 624 NM, EM INTERVALOS DE 10 S POR 1 MINUTO.....	63
FIGURA 31. IRRADIAÇÃO DA AMOSTRA NLS-AÇ COM LED VERMELHO EM 624 NM, EM INTERVALOS DE 10 S POR 1 MINUTO.....	63
FIGURA 32. ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA DE DEGRADAÇÃO DO DPBF FRENTE AO EXTRATO DE CAMU-CAMU (A) E A FORMULAÇÃO NLS-CAMU (B) SOB LUZ AZUL 470 NM	64
FIGURA 33. ESPECTROS DE ABSORBÂNCIA DE DEGRADAÇÃO DO DPBF FRENTE AO EXTRATO DA POLPA DE AÇAÍ (A) E A FORMULAÇÃO NLS-AÇAÍ (B) SOB LUZ AZUL 470 NM	65
FIGURA 34. TERMOGRAMA (TG) DA PERDA DE MASSA DAS FORMULAÇÕES ESTUDADAS.....	66
FIGURA 35. TERMOGRAMA (DSC) PICOS CARACTERÍSTICOS DOS VENTOS ENDOTÉRMICOS APRESENTADOS PELAS FORMULAÇÕES ESTUDADAS.	66
FIGURA 36. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA - MEV DA FORMULAÇÃO NLS-BR, EVIDENCIANDO O FORMATO ESFÉRICO DAS NLS.	67
FIGURA 37. GRÁFICO DE MÉDIAS DA VIABILIDADE CELULAR EM 24, 48 E 72 H. MOSTRA O AUMENTO DA VIABILIDADE CELULAR EM FUNÇÃO DO TEMPO.	68
FIGURA 38. GRÁFICO DE MÉDIAS DA VIABILIDADE DA FORMULAÇÃO NLS-BR CELULAR EM 24, 48 E 72 H.	68
FIGURA 39. GRÁFICO DE MÉDIAS DA VIABILIDADE DA FORMULAÇÃO NLS-AÇ CELULAR EM 24, 48 E 72H	69
FIGURA 40. GRÁFICO DE MÉDIAS DA VIABILIDADE DA FORMULAÇÃO NLS-CA CELULAR EM 24, 48 E 72H.	69
FIGURA 41. MÉDIAS DO HALO DE INIBIÇÃO DE <i>CANDIDA ALBICANS</i> MEDIADA PELOS EXTRATOS E FORMULAÇÕES SOB IRRADIAÇÃO DE LED AZUL.	72

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADRO 1. INDICADORES DE USO PARA SISTEMAS E CARREADORES DE BASE LIPÍDICA	17
QUADRO 2. MECANISMOS DE MORTE CELULAR ATIVADOS PELA TFD.	30
TABELA 1. COMPOSIÇÃO (%) DOS ÁCIDOS GRAXOS PRESENTES NA MANTEIGA DE CUPUAÇU. ...	40
TABELA 2. COMPOSIÇÃO (M/V) DAS FORMULAÇÕES DE NLS ESTUDADAS.....	43
TABELA 3. VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DA VIABILIDADE DAS FORMULAÇÕES EM 24, 48 E 72 H.	70
TABELA 4. VALORES MÉDIOS E DESVIO PADRÃO DA VIABILIDADE DAS FORMULAÇÕES COM PEG EM 24, 48 E 72 H.	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CA	Camu Camu
AÇ	Açaí
BR	Branco
TG	Manteiga de Cupuaçu <i>Theobroma grandiflorum</i>
NLS	Nanopartícula Lipídica Sólida
PEG	Polietilenoglicol
DPBF	Difenilisobenzofurano
ACE	Acetonitrila
EROS	Espécies Reativas de oxigênio
COP	Copaíba
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
FS	Fotossensibilizador
LED	Light Emitting Diode
h	Horas
d	Dias

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVO GERAL	16
1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
2.1	NANOCARREADORES LIPÍDICOS	17
2.2	NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS – NLS.....	18
2.3	TÉCNICAS DE OBTENÇÃO DE NLS.....	19
2.4	TAMANHO DE PARTÍCULA E POTENCIAL ZETA.....	23
2.5	NANOTECNOLOGIA NA ENTREGA DE FOTOSSENSIBILIZADORES.....	24
2.6	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	25
2.7	CLASSIFICAÇÃO DOS FOTOSSENSIBILIZADORES	31
2.8	FOTOSSENSIBILIZANTES DE ORIGEM VEGETAL	34
2.9	MANTEIGA DE CUPUAÇU	39
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
3.1	SÍNTESE DAS NLS.....	41
3.2	CARACTERIZAÇÃO DAS NLS	44
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	47
4.1	CARACTERIZAÇÃO.....	47
4.2	INFLUÊNCIA DA PEGLAÇÃO.....	55
4.3	ESTABILIDADE DAS FORMULAÇÕES.....	56
4.4	MEDIDAS ESPECTROSCÓPICAS.....	57
4.5	MEDIDAS FLUORIMÉTRICAS.....	59
4.6	MEDIDAS DE GERAÇÃO DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO (EROS)	62
4.7	MEDIDAS CALORIMÉTRICAS	66
4.8	IMAGENS DE MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA.....	67
4.9	VIABILIDADE CELULAR.....	67
4.10	FOTO INATIVAÇÃO BACTERIANA	71
5	CONCLUSÃO.....	73
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75

1 INTRODUÇÃO

No contexto científico atual, a nanotecnologia emerge como uma estratégia inovadora para diversos campos da pesquisa, sejam nas áreas médica, diagnóstica, terapêutica, farmacêutica, nutricionais ou cosméticas; ou ainda na indústria têxtil, de base tecnológica como comunicação, energética, entre outras aplicações (ZANETTI-RAMOS, 2015). As multifaces desta nova ciência se dão pela sua gênese nas áreas fundamentais da ciência e tecnologia como a química dos materiais, física, biologia, medicina e engenharias que têm novas aplicações em escala nanométrica, ou até mesmo atômico-molecular (MARQUES, 2014).

Dentre essa gama de novos produtos e materiais que podem ser originados a partir do emprego da nanotecnologia estão as nanoplateformas. São comumente usadas na entrega de fármacos e drogas de diferentes classes (*drug delivery*), servindo para alterar/potencializar algumas características físico-químicas das moléculas como área de contato, solubilidade, interação com a luz, condutibilidade etc. (ZARBIN, 2007).

Dentre essas nanoplateformas que podem ser utilizadas na entrega de fármacos destacam-se os nanocarreadores de base orgânica como os lipossomas, micelas, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões e Nanopartículas Lipídica Sólidas – NLS (TORCHILIN, 2006). As NLS podem ser usadas em aplicações diversas, as que mais se destacam são para o aumento da solubilidade dos fármacos poucos solúveis em água, principalmente os da classe II e IV, de acordo com o Sistema de Classificação de Biofarmacêuticos (BCS), (SHUKLA *et al.*, 2017).

Nas classes dos fármacos que podem ser incorporados com o uso da nanotecnologia estão os conhecidos como fotossensibilizantes (FS). São moléculas que apresentam a capacidade de interagir com a luz em um determinado comprimento de onda, e desencadear uma série de eventos fotofísicos no meio que estiverem presentes (BAPTISTA *et al.* 2017). Esta capacidade fotobiomodulação é a base da Terapia Fotodinâmica - TFD, e os produtos destas reações no meio biológico podem levar ao processo de morte de células tumorais (SPIKES, 1985).

A aplicação da luz para o tratamento de enfermidades remonta aos tempos da Grécia antiga, Egito e Índia, onde a exposição ao sol era utilizada como tratamento de doenças da pele e outros males (DANIELL; HILL, 1991). Atualmente, as técnicas da medicina moderna convergem para a aplicação de FS mediados por nanocarreadores visando a otimização dos tratamentos de diversos tipos de doenças, como lúpus, psoríase, dermatites e câncer (QIDWAI, *et al.* 2020). A aplicação da TFD também pode ser direcionada para a inativação de micro-

organismos como alternativa a fármacos resistentes com aplicação de luz azul (TEGOS; HAMBLIN, 2013).

Quando tomamos como base a biodiversidade da Amazônia brasileira, várias são as possibilidades para a prospecção de novos bioativos presentes em espécies vegetais que podem ter aplicabilidade em terapias que utilizam luz como a TFD, pois muitas moléculas são obtidas preliminarmente de base vegetal (FORESTO, 2021).

Quando a prospecção de novos bioativos é realizada com conjunto do conhecimento tradicional associado, às plantas medicinais passam a servir de base para diversas pesquisas e triagens clínicas, visando uma possível seleção e posterior escalabilidade na pesquisa de novas moléculas (ABRAHAMSE; HAMBLIN, 2016).

Segundo Marques e colaboradores (2019) a incorporação destes agentes FS em nanoplateformas podem melhorar os resultados da estabilização e da entrega dessas moléculas, já que estas nanoestruturas podem ser modificadas quimicamente durante a sua produção e ter suas características físico-químicas direcionadas visando um local específico de entrega no organismo.

A aplicação da nanotecnologia pode aumentar a quantidade de FS disponível em virtude da relação área/volume obtida pelo uso de nanoestruturas, alterando também a velocidade e o rendimento das reações (LI; YAN, 2018).

1.1 Objetivo Geral

Preparar e caracterizar nanocarreadores lipídicos (Nanopartículas Lipídica Sólidas NLS) a base de manteiga de cupuaçu para entrega de compostos hidrofílicos para uso potencial em terapia fotodinâmica, visando a aplicabilidade dessa classe de carreadores.

1.2 Objetivos Específicos

- Preparar NLS com e sem extrato aquoso de plantas amazônicas com adição e sem adição de polímero estabilizante Polietilenoglicol - PEG;
- Caracterizar as NLS obtidas por meio da técnica de DLS para determinar os parâmetros físicos das nanopartículas como tamanho médio, potencial Zeta e índice de polidispersividade; e a morfologia via Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV;
- Avaliar o comportamento térmico das NLS obtidas por meio da técnica de calorimetria DTG e DSC;
- Avaliar a atividade fotodinâmica das NLS contendo extrato de plantas e curcumina; por meio da técnica de decomposição do 1,3-Difenilisobenzofurano (DPBF);
- Determinar a fototoxicidade das NLS sem e com FS frente a linhagens de células epiteliais;
- Avaliar a fototoxicidade em microorganismos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Nanocarreadores lipídicos

Lipídeos são geralmente compostos orgânicos que contêm em sua composição hidrocarbonetos que podem ser extraídos de fontes animais ou vegetais mediante o uso de solventes de baixa polaridade (BRUM *et al.*, 2009). Exemplos de lipídios mais comuns são os óleos, ceras, colesteróis, esteróis, monoglicerídeos, diglicerídeos, triglicerídeos, fosfolipídeos e vitaminas lipofílicas (FAHY *et al.*, 2011).

Por apresentar biocompatibilidade, os lipídeos se tornaram muito populares no desenvolvimento de carreadores para medicamentos e mais recentemente em cosméticos (CHAKRABORTY *et al.*, 2009). No quadro 1, podemos observar as principais razões do uso de sistemas de base lipídica e as características mais relevantes dos carreadores desenvolvidos a partir de lipídeos.

Quadro 1. Indicadores de uso para sistemas e carreadores de base lipídica. Adaptado de ZHOU *et al.* (2018)

Justificativa para uso de sistemas de base lipídica	Características dos carreadores de base lipídica
Adaptabilidade de excipientes	Entrega controlada e direcionada de medicamentos
Versatilidade no desenvolvimento da formulação	Estabilidade do fármaco
Perfil de baixo risco	Incremento e melhora do conteúdo farmacológico em comparação a outros sistemas de transporte
Maior biodisponibilidade oral com menor variação do perfil plasmático	Capacidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos
Alta permeação na entrega tópica	Biocompatível e biodegradável
Inovação de produtos com apelo de mercado	Dose uniforme e melhorada
Escalabilidade	Redução da dose terapêutica devido a melhor absorção
	Perfil de baixo risco

Mishra e colaboradores (2018), reuniram em seu trabalho os principais sistemas de entrega de fármacos de base lipídica. Foram elencadas 22 classes diferentes de carreadores, cada qual com a sua particularidade: microemulsão (ME), nanoemulsão (NE), sistemas auto-emulsionáveis de entrega de fármacos (*SEEDS*), emulsão *pickering* (PE), lipossomas, niossomas, farmacossomas, fitossomas/ herbossomas, lipossomas elásticos (transferossoma), etossomas, arqueossomas, vesossomas, coloidessomas, aquassomas, cubossomas, esfingossomas, ufassomas, emulssomas, novassomas, lipoesferas, micropartículas lipídicas sólidas (*SLMs*) e nanopartículas lipídicas sólidas (*NLS*).

2.2 Nanopartículas Lipídicas Sólidas – NLS

Dentre os carreadores de base lipídica citados no tópico acima, pode-se destacar as Nanopartículas Lipídicas Sólidas – NLS. Esta classe de carreador emergiu na década de 60, como alternativa aos lipossomas na incorporação de ativos hidrofóbicos, mas foi na década de 90 que as NLS seguiram ganhando notoriedade (UNER; YENER, 2007).

As primeiras NLS desenvolvidas variavam sua composição de 0.1 à 30% (p/p) de massa lipídica dispersa em uma solução aquosa contendo surfactante, este agente estabilizador poderia variar de uma proporção de 0.5 à 5% (p/p) em sua formulação (WEBER *et al.*, 2014).

NLS apresentam um tamanho nanométrico e uma matriz (*core*) lipídica sólida à temperatura ambiente e corporal, sendo um sistema diferenciado dos tradicionais sistemas coloidais como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (HOU *et al.*, 2003; SOUTO *et al.*, 2011).

NLS são carreadores coloidais em escala submicrométrica, seu tamanho pode variar de 50 a 1000 nm, com núcleo lipídico sólido e biocompatível de origem animal ou vegetal (ceras, esteróides, ácidos graxos, mono, di e tri glicerídeos) dispersos em água com diversos tipos de emulsificantes e surfactantes (SOUTO *et al.*, 2011).

Tem como característica o tamanho reduzido, a ampla área de superfície e a boa capacidade de encapsulamento do fármaco, que pode ser incorporado de forma homogênea na matriz, na cápsula de cobertura ou ainda no núcleo (*core*) lipídico (MEHNERT; MÄDER, 2012; EKAMBARAM, 2012).

Essa classe de carreadores lipídicos é obtida geralmente pela homogeneização da fase lipídica com uma solução aquosa de surfactantes em temperatura maior que o ponto de fusão do lipídio (WEBER *et al.*, 2014). Dessa maneira é formada uma dispersão tipo óleo e água (O/W) que pode ser utilizada na entrega de fármacos e outros bioativos (ASSIS *et al.*, 2012).

A entrega controlada de fármacos e do conteúdo presente nas NLS torna este carreador vantajoso em comparação a outros sistemas de entrega coloidais. Como seu núcleo é sólido em temperatura ambiente, ocorre menor mobilidade no conteúdo incorporado, possibilitando um maior controle na velocidade de liberação das substâncias presentes na matriz lipídica, melhorando a estabilidade física, sendo indicado na entrega de compostos lábeis (YANG *et al.*, 2014).

Devido à natureza cristalina da matriz das NLS pode ocorrer o processo de expulsão do conteúdo com o passar do tempo de armazenamento (WEBER *et al.*, 2014). Isso ocorre quando a modificação na matriz é pouco ordenada durante a síntese e passa a ser altamente ordenada

após a produção, como predomínio de β -modificações (Figura 1) muito comuns em arranjos cristalinos (WEISS *et al.*, 2008).

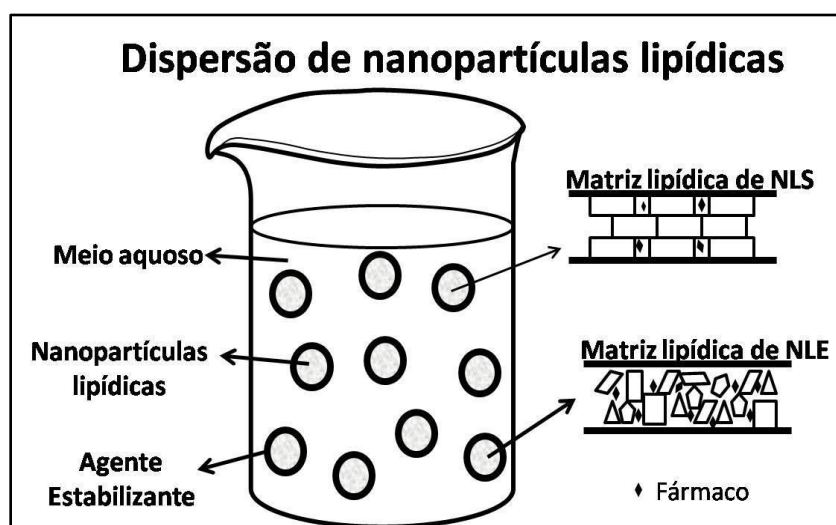


Figura 1. Arranjo da matriz lipídica de NLS e NLE. Modificado de (WEBER *et al.*, 2014)

A composição dos ácidos graxos e triglicerídeos que foram a matriz lipídica da nanopartícula determina o espaço ocupado pela substância de interesse a ser entregue, e essa capacidade de entrega é limitada pelo efeito de cristalização da matriz. Este efeito pode ser contornado pela adição de outros componentes lipídicos (cadeia média), preferencialmente óleos, que permitam a diminuição dessa cristalinidade originando Nanopartículas Lipídicas Estruturadas – NLE ou NLC em inglês (Nanostructured Lipid Carriers), essa nanoestrutura agora passa a permitir maior incorporação do conteúdo de interesse (WEBER *et al.*, 2014).

2.3 Técnicas de obtenção de NLS

NLS podem ser obtidas através de várias técnicas de preparo, dentre elas podemos destacar a Técnica de Homogeneização de Alta Pressão – HAP –, Homogeneização à Quente, Homogeneização à Frio, Método de Microemulsão, Cisalhamento e Ultrassom, Evaporação do Solvente, Emulsificação e Difusão do Solvente (GANESAN; NARAYANASAMY, 2017).

2.3.1 Homogeneização de Alta Pressão – HAP

Esta técnica também conhecida em inglês pela sigla (HPH) *High Pressure Homogenization*, contempla ambos os processos: homogeneização a quente e a frio. Nas duas etapas de preparação, o fármaco é primeiramente solubilizado no lipídio já fundido e seguido de homogeneização sob pressão elevada (TADROS *et al.*, 2004).

2.3.2 Homogeneização à quente

De maneira geral, a temperatura de trabalho é conduzida além do ponto de fusão da fase lipídica utilizada na preparação (FADDA *et al.*, 2013). Uma pré-emulsão é feita contendo o fármaco e o lipídio em estado líquido; e outra fase aquosa contendo o agente emulsificante, e são preparadas em iguais condições de temperatura (GUTIÉRREZ *et al.* 2008).

Na obtenção desta emulsão pode-se utilizar agitação simples, ou aparatos mais elaborados como equipamento do tipo rotor-estator para misturar e reduzir o tamanho das partículas (EKAMBARAM, 2012). A utilização do rotor-estator sem outras técnicas complementares já seria suficiente para obtenção de NLS com tamanho médio adequado (MANEA, 2014). Podem ser utilizadas também como complemento para a redução do tamanho e homogeneidade da amostra a técnica de (HPH) (HOU *et al.*, 2003) e ultrassom (SOUTO *et al.*, 2011).

Para a aplicação da técnica de HPH, a pré-emulsão contendo óleo e água precisa estar de acordo com os parâmetros da formulação, seguindo ciclos (geralmente 3) de homogeneização em pressão elevada, entre 100 e 1500 bar (MARCATO, 2009); mas de acordo com GUO e colaboradores (2015), estes parâmetros podem variar para a produção de NLC utilizadas na administração percutânea de alcalóides, obtendo resultados mais satisfatórios a uma velocidade de 5000 rpm (rotor-estator) na pré-emulsão e 5 ciclos de 800 bar na técnica de HPH.

2.3.3 Homogeneizações a frio

Esta técnica se assemelha à técnica de inversão de fases (PIT) na obtenção da pré-emulsão. Nesta etapa, a fase lipídica contendo um princípio ativo ou fármaco é vertida em uma solução de surfactantes fria, induzindo à formação de micropartículas (YAMADA *et al.*, 2018). Em seguida, a amostra é processada por HPH produzindo nanopartículas que são resfriadas abaixo da temperatura ambiente (FENG e MUMPER, 2013).

Normalmente, a aplicação desta técnica de homogeneização à frio é empregada quando surgem fatores limitantes associados na técnica de homogeneização à quente (PARHI; SURESH 2010). Estas limitações podem ser relacionadas à termolabilidade do fármaco ou composto a ser encapsulado (YOU *et al.*, 2007). Ou ainda quando estes componentes apresentam alguma dificuldade de distribuição na fase aquosa quando condicionadas à temperatura do ambiente, e no processo complexo de cristalização quando considerada as várias

modificações na matriz lipídica depois de fundida e super-resfriada (MEHNERT; MÄDER, 2012).

2.3.4 Método de Microemulsão

Nesta técnica podem ser obtidos sistemas de dupla fase, como óleo em água (O/W), originada por um lipídio com baixo ponto de fusão, que comumente é o ácido esteárico e um agente emulsificante, que pode ser *Tween* ou *Span* (MEHNERT; MÄDER 2001).

Como estes componentes são termodinamicamente estáveis e apresentam uma baixa tensão superficial entre fases, pode ocorrer a formação de micelas (DINGLER; GOHLA, 2002). O processo de obtenção da microemulsão é iniciado pela fusão da fase lipídica na qual é acrescentado o fármaco ou outra substância de interesse por dissolução ou dispersão, de acordo com a sua polaridade (SOUTO *et al.*, 2011). Quando a preparação da microemulsão é concluída, a mesma é vertida sobre uma solução de surfactante resfriada (EKAMBARAM, 2012).

2.3.5 Cisalhamento e Ultrassom

Quando a homogeneização das fases que compõem é adequada, os resultados tendem a ser melhorados. A aplicação da técnica de homogeneização de alto cisalhamento (corte) ou High Shear Homogenization – HSH – é muito empregada para a correta mistura dos componentes de uma formulação estudada (SONNEVILLE-AUBRUN, *et al.*, 2004). Esta técnica consiste na aplicação de altas rotações na homogeneização da amostra, que variam de 5 a 25 mil rpm; isto força a passagem dos componentes da mostra pelo conjunto rotor-estator, quebrando fisicamente a amostra em partes menores (TRIPLETT; RATHMAN, 2009).

Em muitos experimentos, a técnica de alto cisalhamento é complementada pela técnica de ultrasonificação, sendo que, no primeiro processo são formadas partículas com certa heterogeneidade e de escala variada, podendo ser em micrômetros ou nanômetros (PUGLIA *et al.*, 2013).

O equipamento de ultrassom libera quantidade considerável de energia por cavitação diretamente na solução (PATIL; PANDIT, 2007). Uma haste de titânio, em frequências ultrassônicas, faz com que as moléculas lipídicas sejam quebradas em partes menores formando gotículas ou *droplets*, geralmente menores que 1000 nm (WISSING, 2004).

2.3.6 Evaporação do solvente

Podemos obter NLS quando solubilizamos um componente lipídico em um solvente orgânico imiscível em água como hexano, ciclohexano ou acetona, o qual é emulsificado em uma fase aquosa (EKAMBARAM, 2012).

Depois de obtida a emulsificação, o solvente é evaporado sob baixa pressão entre (40 – 60 mbar). Neste procedimento, micropartículas ou nanopartículas são formadas por precipitação do lipídio na fase aquosa (MARCATO, 2009). Quando o tamanho das partículas está na escala de micrômetros esta técnica pode ser complementada utilizando um homogeneizador de alta pressão ou ultrassom para se obter as NLS (MEHNERT; MÄDER, 2012).

2.3.7 Emulsificação e difusão do solvente

Aqui, uma fase orgânica é composta de um lipídio igualmente dissolvido num solvente orgânico imiscível em água como acetona ou ciclohexano (MITRI *et al.*, 2012). Nesta fase é incorporado o fármaco ou o princípio ativo, e pode-se ainda, adicionar um co-tensoativo como a fosfatidilcolina para elevar a estabilidade termodinâmica da emulsão (IMBROGNO *et al.*, 2015). Em seguida, ocorre a emulsificação da fase orgânica em outra fase aquosa contendo tensoativo, posteriormente o solvente orgânico é evaporado em pressão reduzida (EKAMBARAM, 2012).

Neste caso os componentes a serem carreados como ativos hidrossolúveis, podem ser dissolvidos numa fase aquosa que posteriormente vai constituir a fase interna de uma emulsão múltipla tipo A/O/A (MORA-HUERTAS *et al.*, 2011). Esta técnica é usada na incorporação de peptídeos e proteínas em NLS e no uso de formulações poliméricas (LIM *et al.*, 2012).

A emulsificação-evaporação do solvente origina partículas com dimensões menores, próximo de ± 25 nm devido à menor viscosidade da fase interna, que é resultante do lipídio estar dissolvido em um solvente orgânico ao invés de fundido (TROTТА *et al.*, 2003). Há vantagem neste método de evitar a exposição dos princípios ativos a temperaturas elevadas, mas se tem o inconveniente da utilização de solventes orgânicos (SOUTO *et al.*, 2011).

2.3.8 PEGlação

Os polímeros são classificados como moléculas sintéticas ou naturais que se caracterizam por apresentar uma múltipla repetição de átomos ou grupos ligados entre si, que em quantidade podem fornecer propriedades químicas distintas quando aplicados em uma substância de interesse (VILLANOVA, *et al.*, 2010). O Polietilenoglicol (PEG) é um polímero

hidrofílico, biocompatível, sendo um agente de revestimento muito comum por ser atóxico e aprovado pela FDA, é encontrado comercialmente em pesos moleculares que variam de 1000 a 20000 Da (LAURENT, *et al.*, 2008).

NLS podem ser modificadas por meio da adição de polímeros sintéticos e biocompatíveis, por meio da ligação covalente com a estrutura de interesse, pode-se alterar algumas características como solubilidade, toxicidade, aumento do tempo de meia vida, diminuição da toxicidade; sendo fundamental para a melhoria das propriedades destes conjugados (FREITAS, *et al.*, 2010).

O estudo de nanocarreadores modificados pela adição de polímeros como PEG (PEGlação) é importante para a determinação de suas características físico-químicas em sistemas coloidais para aplicação na entrega de substâncias de interesse como moléculas bioativas, observando a influência da adição de PEG durante o processo de síntese em formulações lipídicas.

2.4 Tamanho de partícula e Potencial Zeta

Nos sistemas coloidais as misturas homogêneas apresentam duas fases distintas onde uma é dispersa em outra, que pode ser um sólido, líquido ou gás (JUNIOR; VARANDA, 1999). Quando em escala nanométrica é invisível ao olho humano com tamanho médio entre 1 e 1000 nm; autores mais recentes conceituam a nanotecnologia dentro de um escopo dimensional de 1 a 100 nm apenas (SHREY-SINDHWAN, 2021).

Para que haja estabilidade entre as fases distintas é necessário o uso de agentes emulsificantes como tensoativos ou detergentes, podendo ter natureza iônica ou aniônica (LOCHHEAD; RULISON, 1994). Estes agentes emulsificantes são moléculas que apresentam propriedades anfifílicas e podem adsorver-se na interface das fases no processo de emulsificação, aumentando a estabilidade do sistema (LOCHHEAD, 2017).

Dois indicadores muito utilizados para descrever a estabilidade de sistemas coloidais como emulsões e nanoemulsões, é o potencial Zeta (ζ) e a distribuição de tamanho (CLOGSTON; PATRI, 2011).

Tanto potencial Zeta quanto a distribuição de tamanho são baseadas no espalhamento dinâmico de luz ou *Dynamic Light Scattering (DLS)* em inglês. São técnicas primordiais na caracterização de colóides com carga elétrica superficial e esta técnica se baseia na teoria do espalhamento de Mie para estimar o tamanho da partícula (BERNE; PECORA, 2000).

Um dos primeiros experimentos utilizando uma fonte de luz monocromática para detectar o espalhamento de luz de uma amostra coloidal foi realizado por John Tyndall em 1968,

onde demonstrou que as partículas do meio eram maiores que o comprimento de onda incidente (HUANG *et al.*, 2021).

A técnica de *DLS* é frequentemente utilizada para analisar a distribuição de tamanho das nanopartículas em aplicações biomédicas, pois apresenta vantagem de ser uma técnica de preparação relativamente rápida, podendo ser executada com uma baixa quantidade de amostra sob diferentes condições de pH e temperatura (STETEFELD *et al.*, 2016).

Esta técnica consegue medir o tamanho submicrométrico das amostras pelo regime da flutuação da intensidade da luz espalhada (BHATTACHARJEE, 2016). Quando a formulação apresenta um tamanho reduzido de partícula, há uma tendência de este sistema permanecer em equilíbrio hidrodinâmico (DIGMAN; GRATTON, 2011).

O potencial Zeta (ζ) geralmente é avaliado em conjunto com a técnica de *DLS*, é usado para estudar as propriedades das partículas em dispersões e emulsões, é usado para estimar a carga de superfície, o potencial de superfície, mobilidade eletroforética ou o ponto isoelétrico de sistemas com cargas e a estabilidade (BHATTACHARJEE, 2016). O entendimento destas variáveis pode auxiliar na tomada de decisões para a produção e investigação de sistemas coloidais estáveis (KARMAKAR, 2019).

2.5 Nanotecnologia na entrega de fotossensibilizadores

Os nanomateriais, nanodispositivos ou nanopartículas – NPs oferecem uma contribuição fundamental nas áreas de fármacos e produtos afins (YETISEN *et al.*, 2016). Estes nanomateriais podem ser enriquecidos pela adição de constituintes moleculares a fim de poder interagir com outras moléculas e estruturas celulares para aumentar o Efeito de Permeabilidade e Retenção (*EPR*), (LEPORATTI, 2022).

Nanocarreadores podem ser de maneira ampla, classificados como de base orgânica, base inorgânica, ou híbrida que é a combinação de ambos (ANANIKOV, 2020). Os nanocarreadores de base orgânica consistem em estruturas poliméricas, estruturas de base lipídica (lipossomas, NLS, nanoemulsões), dendrímeros e de base de carbono (fulerenos, nanotubos), de base inorgânica (nanopartículas metálicas, nanopartículas de sílica e pontos quânticos) (MILANE *et al.*, 2008).

Na TFD, nanomateriais orgânicos alcançaram segurança e controle na entrega de FS, que juntamente com nanomateriais inorgânicos elevam as potencialidades nesta modalidade terapêutica (BECHET *et al.*, 2008). Na figura 3, podemos observar as diversas classes de nanoplatarformas que podem ser utilizadas para a entrega de drogas e moléculas em TDF.

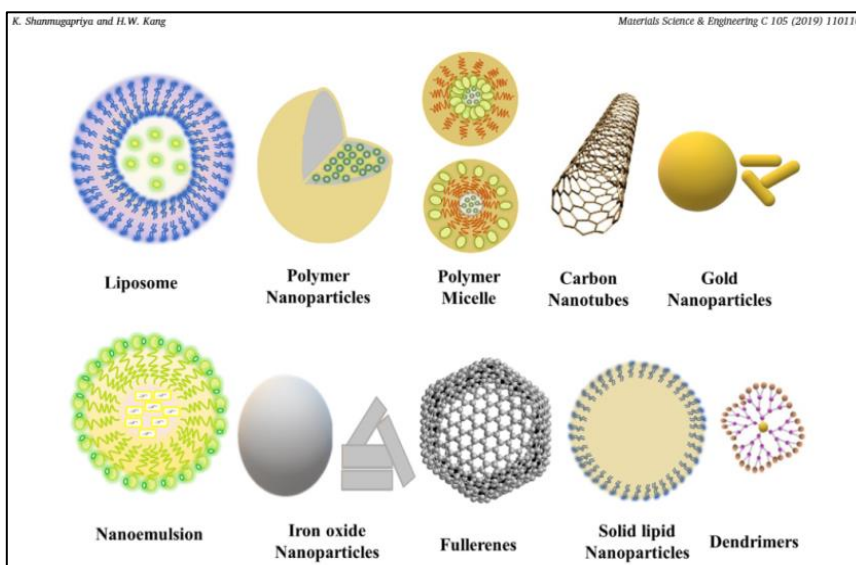


Figura 2. Nanoplateformas para uso em TFD, (SHANMUGAPRIYA; KANG, 2019).

O mecanismo de ação da TFD é dependente da produção de oxigênio singlete e do direcionamento seletivo do FS evitando os tecidos saudáveis (ZALESSKAYAA; ULASHCHIK, 2009). Tais condições podem ser potencializadas com a combinação de NPs como têm sido evidenciadas em estudos pré-clínicos e clínicos (LI E YAN, 2018).

O incremento nos resultados obtidos pelo uso da nanotecnologia aliada a TFD convencional são decorrentes do aumento da superfície em relação ao volume, incremento do FS disponível para o local alvo, coeficiente de extinção molar, juntamente com o rendimento quântico que podem ser modificados com a aplicação de técnicas baseadas em nanocarreadores (QIDWAI *et al.*, 2020).

2.6 Terapia Fotodinâmica

A história da fotomedicina remonta a mais de 3000 anos na Índia, onde a luz do sol era utilizada para propósitos terapêuticos (SELLERA *et al.*, 2014). Estes registros são encontrados no texto sagrado Hindu *Atharva Veda* que data de 1400 AC (WYSS *et al.*, 2000). Pessoas com vitiligo (uma despigmentação desigual da pele) eram tratadas com doses de extratos de plantas (*Eclipraprostata*, *Citrulluscolocinthis* e *Curcuma longa*) (WEISS *et al.*, 2004).

Na tradicional medicina Chinesa e Ayurvédica a planta *Psolareacolilifolia* que contém o componente furanocumarina, também chamada de "psoralen" é usada em aplicações similares (BETHEA *et al.*, 1999). No antigo Egito, outra planta contendo furanocumarina *Ammimajus* era empregada com as mesmas finalidades (HAMBLIN; HUANG, 2013).

Os relatos da luz sendo aplicada com propósitos da ciência médica moderna são convencionalmente datados do início do século 19, em decorrência dos trabalhos de Raab (AMOR; JORI, 2000). Oscar Raab foi aluno de Hermann Von Tappeiner, no Instituto Farmacológico de Munique, e estava envolvido no estudo da acridina, um corante de cor laranja, extraído do alcatrão de carvão que pertence à classe das xantanas, uma molécula compartilha diversos compostos aromáticos comuns aos corantes de acridina (BYVALTSEV *et al.*, 2019).

Raab observou que a quantidade de luz influenciava diretamente na taxa de mortalidade de Infusória, (uma espécie de paramecium usado em experimentos biológicos da época), quando em contato com a acridina, e concluiu que a efetividade da ação do corante dependia diretamente da absorção da luz em função do comprimento de onda adequado (MACHADO, 2000).

Após este achado de Raab e Von Tappeiner, juntamente com outros colaboradores, foram conduzidos outros estudos nos anos seguintes sobre este fenômeno, e cunharam o termo “fotodinâmico” para diferir do fenômeno de “fotossensibilização” observado em filmes fotográficos (SPIKES, 1985).

Em virtude destes trabalhos sobre a fotossensibilização, o grupo de Von Tappeiner descobriu que o oxigênio também era preciso para que ocorresse o efeito fotodinâmico (STEPP, 2003). Esses resultados também estão registrados no livro *"History of photodynamic therapy in dermatology"* (SZEIMIES, 2001).

Lipson e Schwartz no início da década de 50 redescobriram o efeito fotodinâmico quando constataram que uma mistura de Derivados de Hematoporfirina (DHP) apresentou uma maior fluorescência na visualização de tumores durante uma cirurgia ante a Hematoporfirina isolada (LIPSON *et al.*, 1961).

No início da década de 70, Thomas Dougherty e seus colegas do *Roswell Park Cancer Institute* (University of Buffalo, USA) desenvolveram o precursor do que seria o primeiro fotossensibilizante que estaria disponível em escala comercial na década de 90 (KESSEL, 2020). O Photofrin® foi obtido por meio do aperfeiçoamento de técnicas cromatográficas e aplicado no tratamento de câncer de bexiga no Canadá, em 1993 (KENNEDY *et al.* 1990).

Posteriormente o Photofrin®, teve seu uso aprovado nos Estados Unidos, Europa e Japão para estágios adiantados de câncer de pulmão, câncer cervical, adenocarcinoma mesofaríngeo, etc. (DOUGHERTY, 2002; O'CONNOR *et al.*, 2009). Atualmente, diversas são as aplicações da terapia fotodinâmica além da já reconhecida eficácia no tratamento do câncer,

outras aplicações não oncológicas sejam dermatológicas, vasculares, oftalmológicas, dentais, neurológicas, esqueléticas, etc. (CORREIA, 2021).

2.6.1 Mecanismos da Terapia Fotodinâmica

Para que esta técnica seja eficaz é necessária a participação de três elementos fundamentais: fotossensibilizante (FS), Luz para gerar o estímulo e o oxigênio molecular (OGILBY, 2010). A TFD se fundamenta na excitação do FS com um comprimento de onda específico, desencadeando reações fotoquímicas do tipo I e do tipo II (BAPTISTA *et al.* 2017). Estes efeitos podem ser mais bem compreendidos observando-se o diagrama de Jablonski (JAFFÉ; MILLER, 1966).

Os diagramas de Jablonski são ferramentas primordiais para descrever os processos quânticos envolvidos na absorção e na emissão da luz, que podem ser a absorção de um fóton, cruzamento intersistema, conversão interna, fluorescência, fosforescência e transições tripleto-triplete (ASKES *et al.* 2015).

A figura 3 mostra todos os possíveis eventos, que ocorrem quando uma molécula de FS recebe radiação eletromagnética não ionizante, na forma de luz visível (YOON *et al.*, 2013). O FS age como uma “*probe*” molecular, responsável por transferir elétrons e formar Espécies Reativas de Oxigênio – ERO’s ou ROS, em inglês *Reactive Oxygen Species*, que são altamente tóxicas para as células (Oliveira *et al.*, 2015).

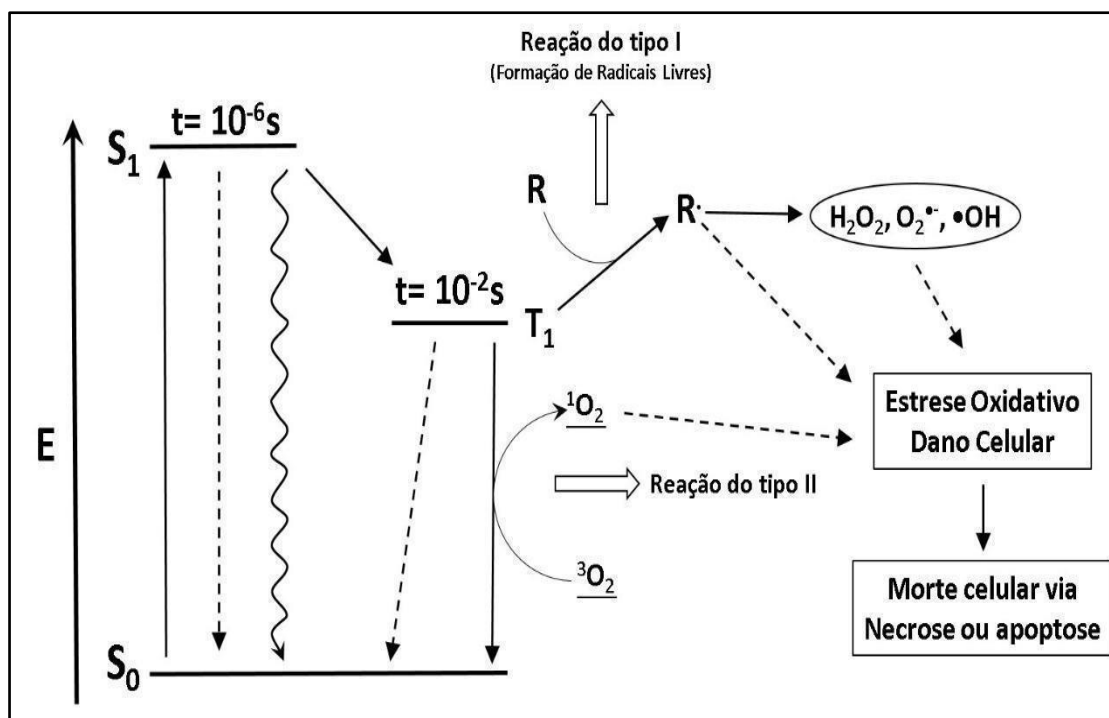


Figura 3. Diagrama de Jablonski. Modificado de (YOON et al., 2013).

Geralmente, o FS em seu estado fundamental possui dois elétrons (e^-) em *spins* opostos no seu orbital de menor energia, sendo ativado por um fóton de luz a partir do seu estado fundamental singlete (S_0) (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002). Para o primeiro nível de excitação de vida curta (S_1) sem a mudança desses *spins*, nesse momento tem-se o estado excitado singlete (BAPTISTA *et al.* 2017).

Nesta fase o FS não pode participar de reações à nível do substrato celular pois seu tempo de vida médio é extremamente curto, variando de nano à picossegundos, e a prioridade do e^- excitado é retornar ao nível fundamental vibracional de zero (LAKOWICZ, 2013).

O FS pode retornar ao seu estado fundamental (S_0) emitindo a energia absorvida por fluorescência ou por conversão interna; pode também se apresentar como alternativa, num relaxamento mais demorado pelo cruzamento de intersistemas formando o primeiro estado tripleto (T_1) (OGILBY, 2010). O estado excitado T_1 do FS pode retornar para o estado fundamental S_0 emitindo fosforescência; com, a energia transferida de T_1 para o oxigênio molecular ou substratos biológicos em forma de ERO's (1O_2 , H_2O_2 , $O_2^{\cdot-}$, $\cdot OH$) substâncias que produzem danos e morte celular, principalmente por necrose ou apoptose (YOON *et al.*, 2013).

Os dois principais caminhos fotoquímicos conhecidos na TFD são reações do tipo I e reações do tipo II (BAPTISTA *et al.*, 2017). Nas reações do tipo I o FS interage com o oxigênio ou outra biomolécula que acaba por resultar na transferência de um átomo de hidrogênio ou

elétron, gerando então as espécies conhecidas como radicais livres (YAN *et al.* 2016). No tipo II da reação, o oxigênio singleto é gerado como resultado da transferência de energia do estado excitado T1 do FS para o estado fundamental tripleto do oxigênio molecular (JAFFÉ; MILLER, 1966).

O oxigênio singleto pode ser considerado a mais danosa das espécies reativas, pois reage com moléculas biológicas variadas, dentre elas α -aminoácidos (triptofano, histidina e metionina), lipídios insaturados e demais componentes das células e membranas nucleares causando danos irreversíveis às células tumorais (CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017).

A maioria dos FS apresenta absorção em um intervalo de 600 – 950 nm que correspondem a “janela terapêutica” ou “janela fotodinâmica” onde os tecidos biológicos apresentam maior absorção dos cromóforos endógenos, onde se aplicam a maioria dos tratamentos mediados pela luz (CASTANO *et al.*, 2004).

2.6.2 Mecanismos de morte celular em TFD

As terapias convencionais como a quimioterapia e radioterapia utilizadas no tratamento de tumores, desencadeiam o processo de morte celular (apoptose) via pontos de checagem do ciclo celular, parada de crescimento e ativação da p53 (HAMBLIN, 2020). Na TFD existe uma tendência da apoptose celular ser desencadeada principalmente por uma resposta ao estresse oxidativo agudo, causada por danos em membrana externa ou interna (mitocondrial), na entrega do citocromo c e formação do apoptossoma envolvendo a caspase (CASTANO *et al.*, 2004).

Geralmente, estes danos ocorrem em sítios subcelulares onde as moléculas de PS estão localizadas, algumas ftalocianinas, ácido aminolevulínico indutor de pro-protoporfirina IX e certos tipos de corantes catiônicos podem causar danos primários nas mitocôndrias, levando ao processo de apoptose (ORTEL *et al.*, 2009). Outras estruturas celulares também são alvos de diferentes classes de PS, dentre as quais a própria membrana plasmática, núcleo, complexo de Golgi, lisossoma e estruturas do citoesqueleto (FERREIRA *et al.*, 2004).

No Quadro 2 ficam elencados os mecanismos majoritários encontrados para tratamentos antitumorais que são desencadeados pela terapia fotodinâmica à nível celular.

Quadro 2. Mecanismos de morte celular ativados pela TFD. Modificado de (MROZ *et al.*, 2011).

	Estrutura celular	Processo
Dano direto à célula	Mitocôndria: Entrega do citocromo <i>c</i> Dano a Bcl-2	Apoptose
	Citoplasma: Dano a NFκB	
	Retículo endoplasmático: Beclin 1 Ativação da mTOR	Autofagia
	Desintegração da membrana celular	Necrose
Oclusão vascular	Depleção local de oxigênio e nutrientes	Apoptose Necrose Autofagia
Ativação da resposta imune	Células T citotóxicas	Apoptose mediada por granzimas

Vale citar que os mecanismos de morte celular dependem das propriedades físico-químicas dos FS, bem como da concentração, tempo de incubação, tempo de irradiação, e etc. (HAMBLIN, 2005)

2.6.3 Foto inativação bacteriana

Na atualidade, é notória a preocupação com o crescimento da resistência que os microrganismos vêm apresentando às diversas classes de antibióticos existentes utilizadas nos tratamentos de infecções bacterianas, contudo a descoberta de novas classes de medicamentos capaz de combater esses agentes não evolui com a mesma rapidez (MAISCH *et al.*, 2005; JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY, 2016).

Dados os alertas direcionados a resistência microbiana a antibióticos como MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) faz-se necessário a busca de alternativas que possam desempenhar um papel alternativo no controle deste tipo de agente patogênico. Microrganismos como vírus, fungos e bactérias podem ser mortos por meio da luz visível com o emprego do FS adequado em um processo chamado de Inativação Fotodinâmica (Photodynamic Inactivation – PDI), (GAD, *et al.*, 2004). TFD vem notadamente se apresentando como ferramenta eficaz no controle desses microrganismos, uma vez que é grande a possibilidade de alvos macromoleculares passíveis de serem atacados por ROS e não possibilitar o desenvolvimento de resistência como nos medicamentos, mostrando-se como terapia antibacteriana alternativa (PERUSSI, 2007).

De acordo com Demidova e Hamblin (2005), a eficiência da inativação bacteriana fica condicionada à classificação das bactérias, se Gram-positivas (+), ou Gram-negativas (-). Geralmente as bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis a PDI, uma vez que suas membranas capturam os corantes mais facilmente e as bactérias Gram – negativas apresentam uma membrana mais complexa como bicamadas lipídicas.

A aplicação de FS com as características adequadas usadas na TFD convencional, pode ter uso semelhante na foto-inativação de micro-organismos, seguindo como tratamento complementar a outros tipos de antibioticoterapia por não apresentar a problemática da resistência, podendo ainda ser mediada por cromóforos fotossensibilizantes endógenos como ferro livre, porfirinas e flavinas (WANG, 2019)

2.7 Classificação dos fotossensibilizadores

Nas aplicações clínicas ou experimentais os fotossensibilizantes precisam apresentar características que viabilizem seu desenvolvimento e aplicação. Os parâmetros que definem a viabilidade do uso de um FS é primeiramente a sua localização na célula, e esta característica é governada pela natureza química do FS como peso molecular, lipofilicidade, anfifilicidade, carga iônica e ligação proteica (CASTANO *et al.*, 2004).

Por apresentarem uma produção considerável de oxigênio singlete, os compostos do tipo porfirinas, clorinas e ftalocianinas possuem as características fotofísicas adequadas para uso em TFD, justificando a grande aplicação dessas classes de moléculas neste tipo de tratamento (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002). Desde os primeiros experimentos utilizando TFD, os fotossensibilizantes vêm se desenvolvendo seguindo uma classificação tradicional e cronológica desta classe de moléculas, podendo-se classificar hoje, os fotossensibilizantes como sendo de terceira geração (MESQUITA *et al.*, 2018).

FS de primeira geração

A primeira geração de FS surgiu a partir dos Derivados da Hematoporfirina– HPD (Figura 4), Schwarz tratou hematoporfirina com ácido acético e ácido sulfúrico a 5% em temperatura ambiente por 30 minutos, obtendo uma mistura de cor púrpura que foi chamada de “Derivados de Hematoporfirina”. Posteriormente, Lipson e colaboradores utilizaram esta preparação injetada em modelo animal em quatro tipos de tumores na época: rabdomiossarcoma, adenocarcinoma mamário, carcinoma de Walker 256 e carcinoma de Flexner-Jobling Shawarz, s/d apud (LIPSON *et al.*, 1961).

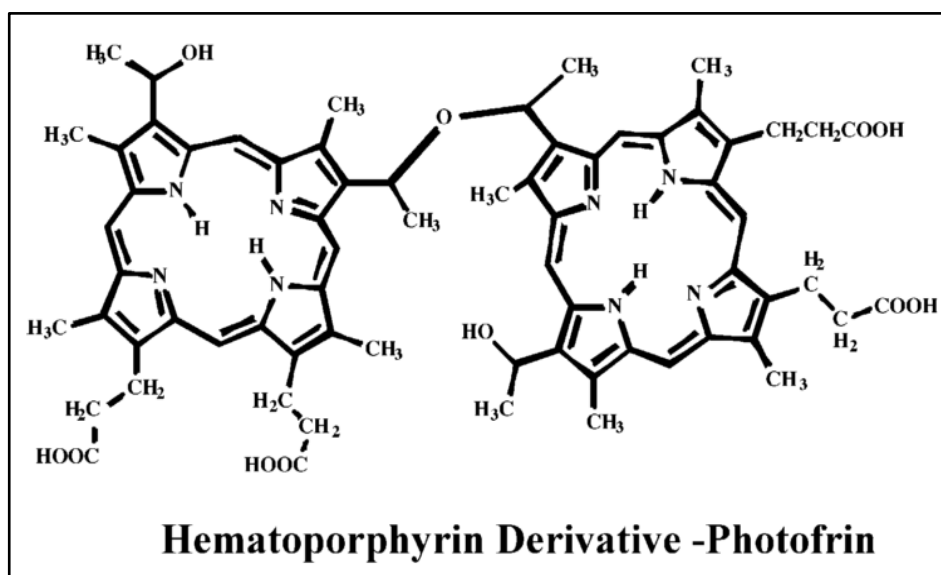


Figura 4. Hematoporfirina e Derivados, (Castano *et al.*, 2004).

Durante o experimento cirúrgico, as células tumorais se destacavam pela fluorescência emitida sobre a luz branca que otimizou a visualização do tecido durante o procedimento (MOAN *et al.*, 1982).

Esta primeira geração de FS foi estudada por muito tempo em diversos trabalhos e experimentos clínicos (KATO, 1996). No decorrer destes experimentos, verificou-se que a hematoporfirina apresentava algumas desvantagens tais como: baixa seletividade com cerca de 0.1-3% da quantidade total do FS sendo encontrado no tecido tumoral (WÖHRLE *et al.*, 1998); prolongada sensibilidade da pele, que fazia necessário evitar a luz solar por semanas (BAAS *et al.*, 1995); a baixa absorção na região vermelha do espectro que fica acima de 600 nm; e pouca penetração nos tecidos tratados, cerca de 5 mm (SPIKES, 1990).

Havia ainda algumas incertezas relacionadas às estruturas predominantes nestes HPD, se éteres ou ésteres e se as cadeias laterais eram formadas majoritariamente por grupos vinil ou grupamentos hidroxietil (DOUGHERTY *et al.*, 1998). Posteriormente, muitas destas limitações foram melhoradas por meio da purificação por HPLC e técnicas cromatográficas de permeação em gel (ISMAIL *et al.*, 1998). Algumas frações de monômeros foram removidas para dar origem a forma comercial altamente ativa que atualmente é conhecida como Photofrin® (KENNEDY *et al.*, 1990).

2.7.1 FS de Segunda geração

No início da década de 80, pesquisas relacionadas com a próxima geração de fotossensibilizantes já se iniciava, e centenas de substâncias candidatas já participavam de testes clínicos, pois apresentavam características de interesse; como, o número de substâncias

oficialmente aprovadas para o tratamento clínico do câncer por TDF é sempre pequeno (KWIATKOWSKI *et al.*, 2018).

A modificação das porfirinas, hematoporfirinas e protoporfirinas já disponíveis foi o caminho mais adequado para o desenvolvimento de novos FS que poderiam ser preparados por sínteses parciais, que gerava vantagens econômicas e ambientais quando se comparada a sínteses totais e complexas (NYMAN; HYNNINEN, 2004).

Esta segunda geração de FS já estava sendo buscada com novos critérios em mente, como sendo substâncias únicas, de fácil interpretação e reprodução, ainda com grande seletividade para o tecido tumoral e rapidamente ser excretada do corpo (GOMER, 1996).

Uma absorção de luz mais longa no range do vermelho de 675 – 800 nm é preferível, pois há uma penetração mais profunda nos tecidos, em torno de 2 – 3 cm; perfazendo uma geração de oxigênio singleto quântico ($\phi\Delta$) maior que 0.3, característico nesta classe de FS (WÖHRLE *et al.*, 1998).

As ftalocianinas, naftalocianinas, clorinas, verdinas e diferentes outros tipos de derivados de hematoporfirinas já apareciam em estudos em diversos trabalhos como “segunda geração” de sensibilizantes para TFD (SPIKES, 1990). Estes compostos, de maneira geral apresentam boas propriedades fotofísicas, podendo apresentar em sua constituição íons metálicos, podendo ser de transição ou não como zinco, alumínio, magnésio, rutênio, ósmio, etc (DEROSA; CRUTCHLEY, 2002).

Apesar desta geração de FS ter melhorado significativamente ante a primeira geração, uma característica muito importante ainda não era encontrada nos FS de segunda geração: a capacidade de acumulação seletiva em um determinado tecido tumoral (RIESZ; KRISHNA, 1988). A ligação de FS em tecidos específicos só foi possível a partir do desenvolvimento de carreadores na terceira geração de FS (TYNGA *et al.*, 2021).

2.7.2 FS de terceira Geração

Além das características encontradas nos FS de primeira e segunda geração, os fotossensibilizantes de terceira geração apresentam propriedades de se direcionarem e ligarem em tipos de tecidos tumorais específicos (SPIKES, 1990).

Esta nova capacidade dos FS se dá pela ligação covalente de vários tipos de modificantes biológicos como aminoácidos, anticorpos monoclonais (*mABs*), lipoproteínas e oligossacarídeos, ou podem ser formulados em sistemas de entrega de drogas (*Drug Delivery*)

como nanopartículas lipídica sólidas – NLS, lipossomas, nanopartículas poliméricas, ciclodextrinas e emulsões com o objetivo de melhorar as propriedades fotofísicas e farmacocinéticas dos PS (YANKOVSKY, 2016).

As células tumorais possuem em sua superfície diferentes antígenos das células normais, isto permite a exploração do uso de anticorpos monoclonais na entrega eficiente de biomoléculas fotossensibilizadoras (TYNGA *et al.*, 2021). Os FS conjugados com *mABs* ligam-se seletivamente às células tumorais facilitando a fotossensibilização enquanto o tecido normal permanece intacto (O'CONNOR *et al.*, 2009).

FS como piro-feoforbideos foram funcionalizados por Zhang e colaboradores (2003) com diferentes sequências de sacarídeos. Estes conjugados visam a ligação com glicoproteínas expressas diferencialmente na superfície de várias células tumorais.

Muitas dessas classes de substâncias como, por exemplo, as porfirinas são hidrofóbicas, e tendem a agregar-se em sistemas aquosos, o que acaba diminuindo a eficiência da ação do FS (CASTANO *et al.*, 2004). Recentemente, os nanomateriais biodegradáveis e biocompatíveis combinados com FS têm recebido atenção considerável, pois podem superar limitações críticas apresentadas por estas moléculas (LIM *et al.*, 2012).

Tomando como exemplo estas limitações, Lima e colaboradores (2013), encapsularam Hipericin em NLS e testaram em linhagens tumorais HEp-2 e B16-F10. Pramuál e colaboradores (2017), incorporaram 5,10,15,20-tetrakis(4-hidroxi-fenil)-21H,23H-porfin (pTHPP) em um híbrido de polímero-lipídeo-PEG para uso e TFD contra linhagem de células de carcinoma da tireóide.

2.8 Fotossensibilizantes de origem vegetal

Produtos de origem natural são utilizados para o tratamento das mais diversas enfermidades desde os tempos antigos na medicina tradicional (BRAGA, 2021). Tais produtos podem ser de origem mineral, animal ou vegetal, e geralmente estão associados a um forte conhecimento popular (KOEHN; CARTER, 2005). Mesmo com o avanço da biotecnologia e outras técnicas para obtenção de novas moléculas, os produtos naturais continuam a desempenhar um papel altamente significativo na descoberta de novos fármacos e no desenvolvimento de novos processos (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Durante o século 19 o conhecimento sobre os constituintes químicos presentes nas plantas ficou mais evidente, e no início do século 20 as atividades fotodinâmicas destes compostos foram mais bem esclarecidas (SENAPATHY *et al.*, 2020). A clorofila *a* (Chl *a*), pigmento verde predominante em todos os organismos que realizam fotossíntese oxigênica, é

composta por um anel esqueleto clorínico porfirinado, sendo responsável por estas propriedades fotofísicas (EBERMANN *et al.*, 1996).

Muitas são as espécies de plantas que compõem a diversidade da Amazônia brasileira, e esta grande variedade de organismos vegetais podem contribuir de forma muito significativa para a pesquisa e o descobrimento de novas moléculas com potencial aplicação na TFD (ELISABETSKY; SHANLEY, 1994).

Na última década vários trabalhos foram publicados trazendo o estudo de possíveis agentes fotossensibilizantes presentes em espécies vegetais (MANSOORI *et al.*, 2019). Destes, pode-se citar os trabalhos desenvolvidos em parceria entre a Universidade Federal do Acre – UFAC – e pela Universidade de Brasília – UnB, do ano de 2015 e de 2017, respectivamente.

Os trabalhos trazem extratos de plantas com atividade fotodinâmica baseados em nano plataformas. Rodrigues e colaboradores (2015) avaliaram a atividade fotodinâmica do extrato etanólico de cajuru *Arrabidaea chica* com resultados satisfatórios contra linhagens celulares tumorais de adenocarcinoma mamário humano MCF-7.

Monge-Fuentes e colaboradores (2017) que avaliaram a fotoatividade de nanoemulsões do óleo de Açaí (*Euterpe oleraceae*) em células de melanoma NIH/3T3 e B16F10 com 82% de redução de volume tumoral na TFD.

A fototoxicidade do extrato hidroetanólico das folhas de *Tectona grandis* foi testada por Furtado e colaboradores (2017) contra linhagens de células tumorais de melanoma B16 F10, demonstrando razoável fototoxicidade sob irradiação com led vermelho. Já a incorporação do extrato em nanoemulsões do tipo óleo/água reduziu a toxicidade do extrato em relação à forma livre.

Existe ainda uma grande variedade de exemplares da flora amazônica passíveis de estudos fitoquímicos com aplicabilidade em TFD. Dentre as grandes variedades de espécies presentes na floresta, podemos citar plantas conhecidas por suas propriedades terapêuticas, nutracêuticas e antioxidantes como Copaíba, Açafrão da Terra, Açaí e Camu-Camu que podem ter suas propriedades fotofísicas estudadas.

2.8.1 Copaíba

Copaifera multijuga Hayne pertence à família *Leguminosaceae* com cerca de 18 mil espécies que compõe aproximadamente 650 gêneros e está amplamente distribuída ao redor do mundo apresentando uma grande variedade de produtos com interesse econômico, como folhas, sementes, legumes verdes, flores e resinas (STASI e LIMA, 2002).

A *C. multijuga* é uma árvore presente em praticamente toda a Amazônia brasileira com exemplares adultos que podem alcançar 30 m de altura. Do tronco é extraído um óleo resinado que é produzido à partir do metabolismo secundário da planta, serve como defesa do indivíduo contra insetos, fungos e bactérias. Este óleo-resina é extraído por meio de um furo no tronco da árvore que se encontra distribuído no lenho em canais (esquizógenos) secretores (PIERI *et al.*, 2009).

Já o óleo de copaíba tem suas propriedades medicinais reconhecidas há vários séculos pelos indígenas (MACIEL, *et al.*, 2002). No Brasil imperial tinha papel importante como medicamento extra-oficial utilizados por expedicionários no desbravamento de novas regiões do interior (VEIGA-JUNIOR; PINTO, 2002). As aplicações do óleo de copaíba vão desde fixador de aromas na indústria de perfumes, à emoliente, bactericida, anti-inflamatório em sabonetes, cremes e loções na indústria cosmética, na indústria de tintas e vernizes como secativo, amolecedor e solvente, etc. (VEIGA JUNIOR; PINTO, 2002).

Um dos efeitos mais estudados do óleo de copaíba é sua propriedade anti-inflamatória e também a atividade antifúngica, analgésica, antitumoral, cercaricida, pesticida, antimicrobiana, antibactericida e repelente de insetos (VASCONCELOS *et al.*, 2008; DEUS *et al.*, 2009).

2.8.2 Açafrão da terra

O açafrão é uma planta conhecida mundialmente, geralmente utilizada como condimento, seu rizoma é capaz de produzir um pó de coloração laranja - amarelado muito utilizado no preparo de alimentos. A *Curcuma longa* é uma monocotiledônea, herbácea perene que pertence à família mesma do gengibre (Zingiberaceae), com seu centro de origem na Índia, mas de ampla distribuição (GOVINDARAJAN, 1980).

O gênero *Curcuma* apresenta várias espécies de plantas, no Brasil a *Curcuma longa* L. é geralmente conhecida como açafrão da terra ou açafrão da Índia, muito comum em climas tropicais (MILÁN, 1994). Os componentes majoritários encontrados na curcuma são: a curcumina, a dimetoxicurcumina e a bisdimetoxicurcumina, estes elementos também são conhecidos como curcuminóides e são principais responsáveis pelas propriedades terapêuticas dessa planta (GOEL *et al.*, 2008; MARTINS, *et al.*, 2009).

A curcumina é um potente polifenol capaz de desencadear vários sinais moleculares à nível celular, dentre as propriedades terapêuticas conhecidas estão: anticoagulante, antifúngica, anti-inflamatória, antimalárica, antioxidante, antiviral entre outras (FERREIRA, *et al.*, 2019).

DAMYEH e colaboradores (2020), abordaram como a curcumina pode ser utilizada como um promissor agente para a preservação de vegetais frescos contra a ação de contaminantes.

A aplicação da curcumina também tem sido estudada no combate a microorganismos, mais especificamente mediada pela aplicação da luz (TFD). JIANG e colaboradores 2014, avaliaram o dano nas membranas celulares de *Staphylococcus aureus*, através da fotoinativação mediada por curcumina, além de bactérias, fungos como *Aspergillus flavus* também foram testados sob a ação da luz tendo a curcumina como agente FS (TEMBA *et al.*, 2016).

Estudos evidenciam que a curcumina apresenta também atividade fotofísica dual, hora pode se apresentar como produtor de EROS, outra como acceptor de radicais livres como exemplo o $^1\text{O}_2$ (PRIYADARSINI, 2009). Existe ainda a hipótese que a curcumina pode apresentar esse comportamento dual em dependência do ambiente celular que se apresenta (AGGARWAL e SUNG, 2009).

As aplicações dadas para a curcumina em diversos tipos de tratamentos e aplicações em TFD é reportada com sucesso em diversos trabalhos e com resultados significativos e mostrando-se como ativo natural exitoso neste campo de aplicação.

2.8.3 Camu-Camu

A família *Myrtaceae* concentra algumas das espécies brasileiras com grande potencial tecnológico para a indústria, principalmente o gênero *Myrcicaria* com destaque para a jabuticaba. O Camu-Camu (*Myrciaria Dubia*) é uma árvore de porte médio encontrada na região amazônica em proximidade de rios ou lagos, que produz um fruto pequeno e arredondado de cor avermelhada ou rocha rica em ácido ascórbico e antocianinas (BORGES *et al.*, 2014; CHAGAS, 2019).

Esta espécie tem recebido especial atenção nos últimos anos pelo fato dos seus frutos apresentarem um elevado conteúdo de vitamina C, cerca de 2,7 g (podendo chegar em 3 g) em média para 100 g de polpa. Isso equivale a 60 vezes o conteúdo de vitamina C do limão, superando a acerola que apresenta um teor de vitamina C de 1,79 g para 100 g de polpa (SILVA *et al.*, 2012).

Estes valores elevados fizeram que esta espécie ganhasse destaque para as indústrias cosméticas, farmacêuticas e alimentícias, com a vantagem do tipo de vitamina C encontrada no Camu-Camu ser apropriada para essas aplicações (SMIDERLE; DE SOUSA, 2010).

Na literatura científica podemos encontrar trabalhos que exploraram o efeito antioxidante e anti-inflamatório do Camu-Camu sobre diversas situações. Por exemplo, Inoue e colaboradores (2008) avaliaram a suplementação dietética de voluntários fumantes que

durante sete dias ingeriram 70 mL de suco camu-camu e observaram a redução nos marcadores para o estresse oxidativo maiores que o grupo tratado com vitamina C em pastilhas (INOUE *et al.*, 2008).

Do Carmo e colaboradores (2020) investigaram o efeito antiparasitário de extratos hidroetanólicos das sementes de camu-camu e observaram que os extratos apresentaram atividade anti schistosomicidal e antimalárica tendo a methyl vescalagina como principal bioativo responsável por estes resultados.

2.8.4 Açaí

Amplamente conhecida na região amazônica e apreciada na alimentação regional, o açaí *Euterpe oleracea* (Mart.), pertence à família *Arecaceae*, que engloba atualmente cerca de 200 gêneros e aproximadamente 2600 espécies, com distribuição tropical e subtropical, com ocorrência espontânea na região amazônica, encontrada em regiões de várzea no estuário do rio Amazonas (DE OLIVEIRA *et al.*, 2000).

O fruto da palmeira é processado, e na despolpa é obtido um caldo grosso (suco) que é consumido *in natura* ou utilizado no preparo de sorvetes e doces (SILVA *et al.*, 2022). É um alimento muito completo por ser fonte de diversas vitaminas, como a vitamina B1 e E, além de ferro, fósforo, minerais, fibras e lipídios (NEVES *et al.*, 2015).

O açaí tem um grande efeito antioxidante que é atribuído às antocianinas, uma classe de flavonoides que exerce efeitos protetores contra diversas doenças, principalmente cardiovasculares, juntamente com polifenóis e ácidos graxos essenciais como Ômega 6 e 9 e ácido linoleico conjugado (ROCHA; BEZERRA, 2015; VELASQUE; LOBO, 2016).

O efeito antioxidante do açaí ocorre pela inibição ou diminuição dos efeitos causados pelo estresse oxidativo ou por outras classes de radicais livres oxidantes, diminuindo danos ao DNA e a outras macromoléculas (ROCHA; BEZERRA, 2015). As principais classes de moléculas responsáveis pelos benefícios do açaí são os polifenóis, dentre estes podemos destacar as antocianinas cianidina-3-glucosídeo, cianidina-3-ruteosídeo, cianidina-3-sambubiosídeo, peonidina-3-ruteosídeo, pelargonidina-3-glucosídeo e delphinidina-3-glucosídeo, sendo a cianidina-3-glucosídeo a antocianina encontrada em maior quantidade na polpa do fruto (CEDRIM *et al.*, 2018).

2.9 Manteiga de Cupuaçu

Theobroma grandiflorum (Willdenow ex Sprengel) Schumann, pertence à mesma família do cacauzeiro, é classificado taxonomicamente na família Sterculiaceae, que apresenta cerca de 50 gêneros e 750 espécies entre árvores e arbustos todas predominantemente tropicais (CORAL, 1992).

É um fruto tipicamente amazônico, sendo cultivado principalmente nos estados do Amazonas, Pará, Rondônia e Acre. Este fruto é muito apreciado na região amazônica pelo seu aroma intenso e pela versatilidade de produtos que vão desde a polpa, doces e geleias, passando por licores e até análogos do chocolate (CETEFAM, 2007).

Do processamento das sementes dos frutos do cupuaçu pode ser obtido um óleo fixo também conhecido como manteiga de cupuaçu, com grande aplicabilidade tanto na indústria alimentícia, quanto na indústria cosmética (IBIAPINA *et al.*, 2021). Na indústria alimentícia pode ser utilizada como análogos substituintes da semente de cacau, pois apresenta ponto de fusão semelhante (cupuaçu 19-34 °C; cacau 25-35 °C) com alta digestibilidade (aproximadamente 91%) (COHEN *et al.*, 2003).

Na indústria cosmética, as gorduras de origem vegetal têm servido como base na preparação de diversas formulações e nas mais variadas aplicações como: cremes hidratantes, emolientes e emulsões (GOMES *et al.*, 2022). A manteiga de cupuaçu é rica em compostos antioxidantes entre eles a teograndina I e II em complemento a outros flavonóides já conhecidos (YANG *et al.*, 2003).

A manteiga de cupuaçu é um triglicerídeo que tende a solidificar-se em temperaturas menores que 30 °C (COHEN *et al.*, 2003). Essa característica se dá por haver em sua composição uma quantidade equilibrada de ácidos graxos insaturados e saturados, como ácido oléico, ácido araquídico e ácido esteárico (tabela 1). Esta composição produz uma manteiga com elevada capacidade de hidratação e umectação, que possibilita a recuperação da elasticidade natural da pele (COHEN; JACKIX, 2009).

Este bioproduto é considerado um excelente emoliente, e suas propriedades químicas auxiliam na estabilidade de emulsões devido a sua hidrofiliabilidade atribuída entre as ligações de hidrogênio da água com os fitoesteróis (TEIXEIRA, 2014).

FLECK e NEWMAN (2012) observaram em laboratório que este triglicerídeo possui alta capacidade de retenção de água, em torno de 440%, ou seja, 1 kg de manteiga de cupuaçu pode absorver até 4.4 kg de água sob agitação sem apresentar divisão de fases, sendo considerado muito promissor no cuidado com a pele, mais até que a manteiga de karité e a lanolina que pode provocar sensibilidade e alergia em algumas pessoas.

Tabela 1. Composição (%) dos ácidos graxos presentes na manteiga de cupuaçu. Adaptado de (COHEN e JACKIX, 2009)

Ácido Graxo	%
Ácido mirístico (C14:0)	0,08
Ácido palmítico (C16:0)	11,25
Ácido palmitoleico (C16:1)	0,40
Ácido esteárico (C18:0)	38,9
Ácido oleico (C18:1)	38,79
Ácido linoléico (C18:2)	2,39
Ácido araquídico (C20:0)	7,97
Ácido linolênico (C18:3)	0,22
Ácido behênico (C22:0)	0,74
Saturados – totais	58,13
Monoinsaturados – totais	39,19
Poliinsaturados – totais	2,61

A fração insaponificável dos fitoesteróis presentes na manteiga de cupuaçu agem em nível celular como reguladores do balanço hídrico na pele, apresentando ainda atividades anti-inflamatórias. Estes fitoesteróis são utilizados em aplicações tópicas no tratamento de ulcerações e dermatites estimulando o processo de cicatrização (OLIVEIRA, 2003).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Na preparação das NLS foi utilizada como componente da fase lipídica a manteiga de cupuaçu – TG (*Theobroma Grandiflorum*) (Shum.), adquirida juntamente à Associação de Produtores Rurais Vencedora – ASPRUE – em um sistema de Reflorestamento Econômico Consorciado e Adensado – RECA.

A polpa de Açaí (*Euterpe Oleraceae*) (Mart.) foi adquirida em mercado local, filtrada, liofilizada e mantida sob refrigeração até a data do experimento.

Os tensoativos usados para a obtenção das formulações foram monolaurato de polioxietileno de sorbinato 80 TWEEN (Sigma Aldrich UK) e monooleato de sorbitano 80 SPAN (Sigma Aldrich USA), Polietilenoglicol – PEG 1000 (Sigma Aldrich USA), curcumina (Sigma Aldrich USA), água ultrapura obtida no Aqua Master ALL® (Gehaka).

Os reagentes utilizados no estudo da fotodecomposição foram 1,3-Difenilisobenzofurano (Sigma Aldrich USA). Todos os solventes utilizados eram de grau analítico e espectroscópico, e foram utilizados assim como recebidos.

As medidas espectroscópicas foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601 Japan), e as medidas de fluorescência molecular foram realizadas em espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS 55 UK). As cubetas utilizadas eram de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

As análises de calorimetria foram realizadas em um calorímetro Netzsch modelo Jupiter STA449 – F3 em uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 20 mL min⁻¹, e taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até a temperatura final de 600 °C. A massa da amostra analisada foi de 20 mg, em cadinhos de óxido de alumina.

Para a irradiação inicial das amostras e testes preliminares foi utilizado um reator fotoquímico Delpho (Multi-Fotons 320RA). Para irradiação das células nos ensaios *in vitro* foram utilizados Diodos Emissores de Luz – LED - de 50 W nos comprimentos de onda de 450 nm (Azul).

3.1 Síntese das NLS

A obtenção das NLS foi realizada utilizando a técnica de cisalhamento e ultrasonificação para obtenção da homogeneidade e estabilidade das formulações (FADDA et al., 2013). Para a preparação da pré-emulsão à quente foi utilizado um homogeneizador tipo

rotor-estator da marca IKA, modelo Ultra Turax® - T18 (figura 5 A). Junto a este aparato foi utilizado um agitador magnético com aquecimento, da marca Quimis modelo Q261- 22.



Figura 5. Homogeneizador tipo rotor-estator (A). Sonicador / Desruptor de células (B).

Para a redução da pré-emulsão em partículas com tamanhos menores, foi utilizado um equipamento tipo sonicador/desruptor de células (figura 5 B), marca Sonoplus Bandelin modelo UW 2070, equipado com haste de titânio.

A composição das fases que constituem as formulações de NLS está descrita a seguir, na tabela 2.

Tabela 2. Composição (M/V) das formulações de NLS estudadas.

Identificação das Formulações	Componente	Composição
NLS-BR	TG	0,5 g
	Tween 80	0,2 g
	Span 80	0,2 g
	Água (qsp)	19,1 mL
NLS - Açaí	TG	0,5 g
NLS - Cop	Tween 80	0,2 g
NLS - Camu	Span 80	0,2 g
	Extrato	0,01 g
	Água (qsp)	19 mL
NLS- PEG	TG	0,5 g
	Tween 80	0,2 g
	Span 80	0,2 g
	PEG	0,1 g
	Água (qsp)	19 mL
NLS-PEG – Açaí	TG	0,5 g
NLS-PEG - Cop	Tween 80	0,2 g
NLS-PEG – Camu	Span 80	0,2 g
	PEG	0,1 g
	Extrato	0,01 g
	Água (qsp)	18,9 mL

Na preparação das pré-emulsões a técnica de homogeneização à quente (MEHNERT, 2001) foi utilizada no processo inicial do preparo. As formulações foram preparadas em tubos de ensaio de vidro de 20 mL cada.

A fase lipídica contendo o surfactante foi aquecida a $55 \pm 5^\circ\text{C}$ para a fusão total dos componentes. Em seguida, as amostras foram misturadas à fase aquosa com o auxílio de um homogeneizador do tipo rotor-estator de alto cisalhamento por um período de 10 minutos a uma velocidade de 7.000 rpm (MANEA, 2014).

Para a obtenção das formulações contendo o extrato de plantas, foi adicionado na fase aquosa do preparo, 0,01 g de extrato seco por mL de água. Após a obtenção da pré-emulsão devidamente homogeneizada, cada amostra foi novamente processada em equipamento de ultrassom por um período igual de 10 minutos, para obtenção de partículas em escala nanométrica. Ao final do processo de ultrassonificação, cada formulação foi resfriada à temperatura ambiente sob agitação constante por 10 minutos (RAMOS, 2017).

3.2 Caracterização das NLS

3.2.1 Espalhamento Dinâmico de Luz

A média do diâmetro e o índice de polidispersividade (PDI) das dispersões de NLS foram determinadas por DLS usando um Zetasizer Nano ZS90 (Malvern Instruments; Malvern, UK).

As medidas foram realizadas nas seguintes condições: comprimento de onda do laser (He-Ne) em 633 nm, ângulo de espalhamento fixo em 173° e modo de resolução normal. As leituras foram realizadas com cubeta de poliestireno (DTS 0012) utilizando um volume de 1,5 mL para facilitar as medições. Cada amostra foi diluída na proporção 1:100 com água ultrapura para cada medição e as leituras foram realizadas em triplicata a uma temperatura de 25 °C.

3.2.2 Potencial Zeta

O potencial Zeta (ζ) das partículas lipídicas foi realizado usando o ZetaSizer Nano ZS90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). O equipamento mede a direção e a velocidade em que as partículas se movimentam quando aplicado um campo elétrico, e é calculado baseado no modelo de Smoluchowski (Malvern, 2014).

As amostras foram diluídas na proporção 1:100 com água ultrapura e 0,75 mL do volume da amostra foi acondicionada em cubeta de poliestireno modelo (DTS 1070), para análise. As leituras foram realizadas em triplicata a uma temperatura de 25 °C.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura - MEV

As imagens da morfologia e o tamanho das NLS foram no Laboratório Temático de Microscopia e Nanotecnologia - LTMN do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, utilizando um microscópio eletrônico de varredura (MEV), (TESCAN, modelo VEGA 3) com detector SE, tensão de trabalho 5 kV e distância de trabalho de 4,96 mm. As amostras foram metalizadas previamente à análise com uma camada de ouro utilizando um metalizador (BAL TEC, modelo CPD 050) por um período de 60 s em 50 mA.

3.2.4 Estabilidade das Formulações

As formulações foram armazenadas em armário protegido de luminosidade, em temperatura ambiente. As amostras foram analisadas em intervalos de tempo que variou de 24,

48, 72 h, até 21 dias. Nos intervalos de tempo foram realizadas medidas de DLS e potencial Zeta.

3.2.5 Teste de viabilidade celular

O teste de citotoxicidade foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, conforme a metodologia de AHMED e colaboradores (1994) com o intuito de analisar o efeito tóxico do óleo em células da linhagem MRC-5 após exposição por 72 h. Em placas de 96 poços, as células de MRC-5 foram plaqueadas na concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço.

Após 24 h de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com NLS nas concentrações de 50, 6,25 e 1,56 $\mu\text{g/mL}$. Passados os tempos de tratamento, adicionou-se 10 μL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura), ou seja, da resazurina na respectiva triplicata de tratamento.

Para controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura com DMSO a 0,01 %. Após o tempo de metabolização da resazurina (3h), realizou-se a leitura da fluorescência em leitor de ELISA. A viabilidade foi calculada conforme a fórmula: % viabilidade = (Abs da amostra / média da Abs do controle negativo) x 100.

3.2.6 Teste de fotoinativação microbiana

Cepa padrão testada foi de *Candida albicans* (ATCC 10231) que foram suspensas em solução salina estéril (0,9%) na escala 0,5 de Mcfarland e estriada em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose com swab estéril. Passados 10 min de repouso para que a suspensão aderisse ao meio, discos de papel de filtro de 5 mm estéreis foram embebidos 10 μL das formulações e foram dispostos sobre o meio.

A placa controle não irradiada foi protegida por papel alumínio e reservada. A placa teste foi irradiada com led azul de 50 W por um período de 10 minutos (figura 6), ambas foram incubadas à 37 °C por 24 h. Após a incubação, a fotoinativação dos extratos e das formulações foram analisadas a partir da dimensão dos halos de inibição, medidos com o auxílio de uma régua.

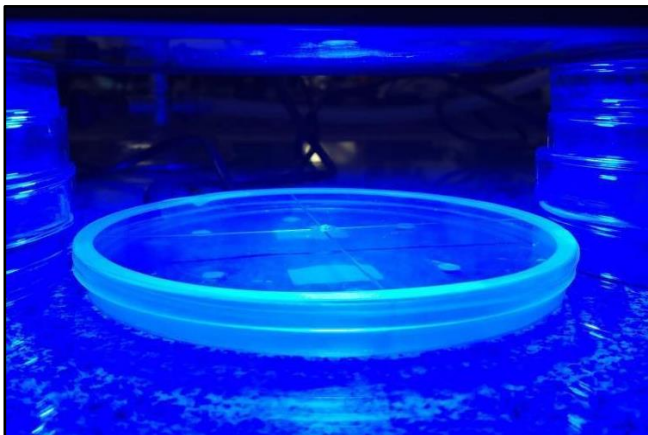


Figura 6. Irradiação por LED azul das placas crescidas com *Candia albicans*, por 10 minutos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Caracterização

4.1.1 Características coloidais das formulações de Açaí

Para a formulação NLS-BR foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $116,2 \pm 1,27$ nm (figura 7), com um índice de polidispersividade médio de 0,172.

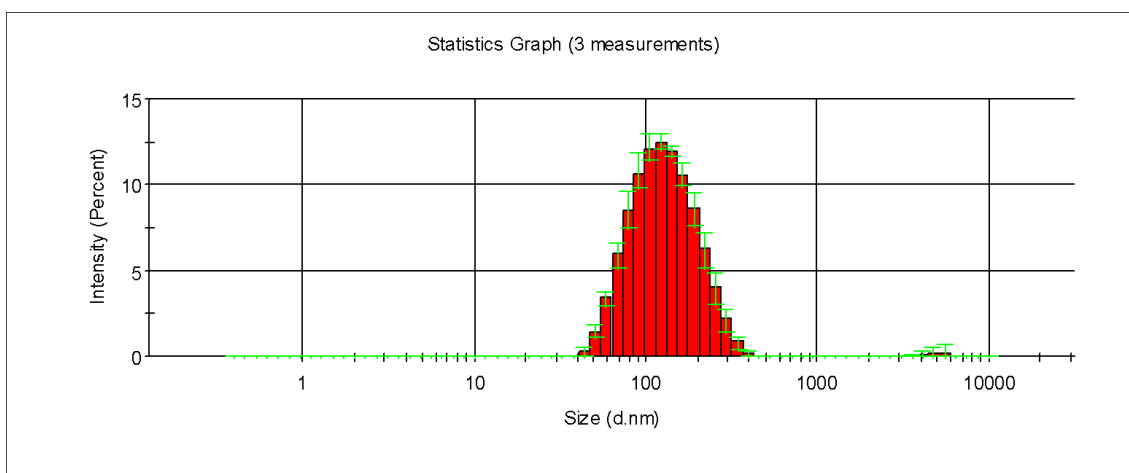


Figura 7. Tamanho médio de $116,2 \pm 1,27$ nm obtido na formulação NLS-BR.

Para a formulação NLS-AÇ foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $108,1 \pm 1,05$ nm (figura 8), com um índice de polidispersividade médio de 0,186.

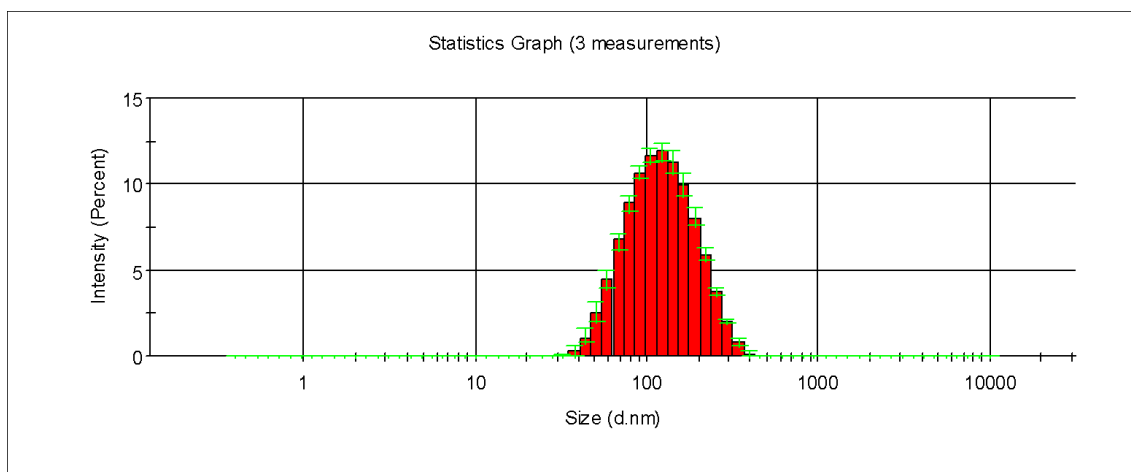


Figura 8. Tamanho médio de $108,1 \pm 1,05$ nm obtido na formulação NLS-AÇ.

Para a formulação NLS-PEG foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $103,7 \pm 1,23$ nm, com um índice de polidispersividade médio de 0,174 (figura 9).

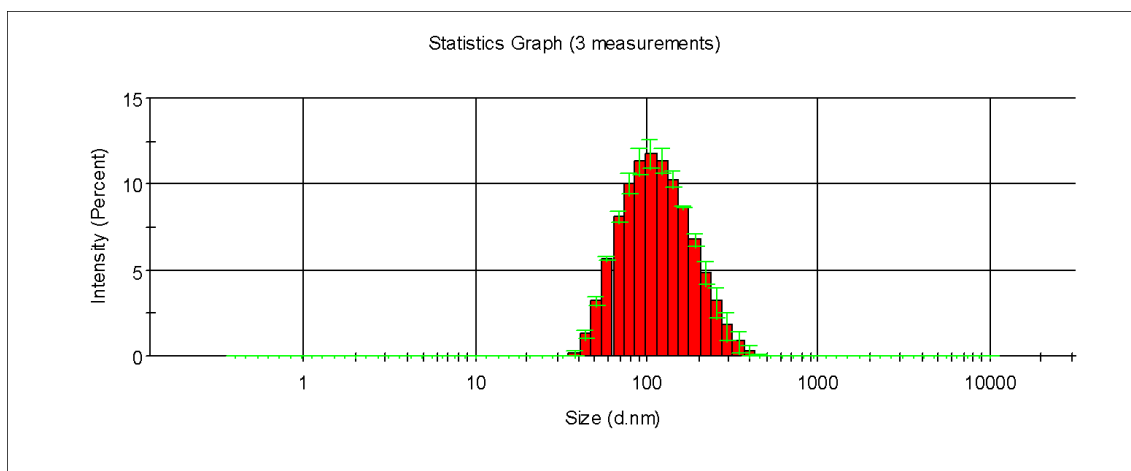


Figura 9. Tamanho médio de $103,7 \pm 1,23$ nm obtido na formulação NLS-PEG.

Para a formulação NLS-PEG-AÇ foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $122,9 \pm 1,47$ nm (figura 10), com um índice de polidispersividade médio de 0,196.

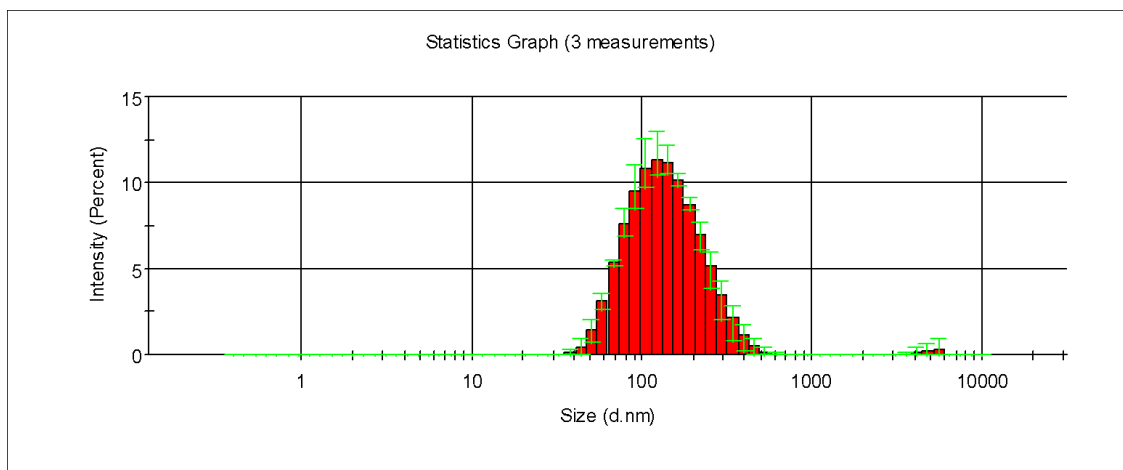


Figura 10. Tamanho médio de $122,9 \pm 1,47$ nm obtido na formulação NLS-PEG-AÇ.

Os valores de potencial Zeta se apresentaram dentro da faixa dos -35,1 mV para as formulações NLS-PEG-AÇ. Para as formulações NLS-AÇ o valor ficou em -33,9 mV; ao passo que na formulação NLS-BR -34,6 mV e na formulação NLS-PEG o valor obtido foi de -32,8 mV (figura 11).

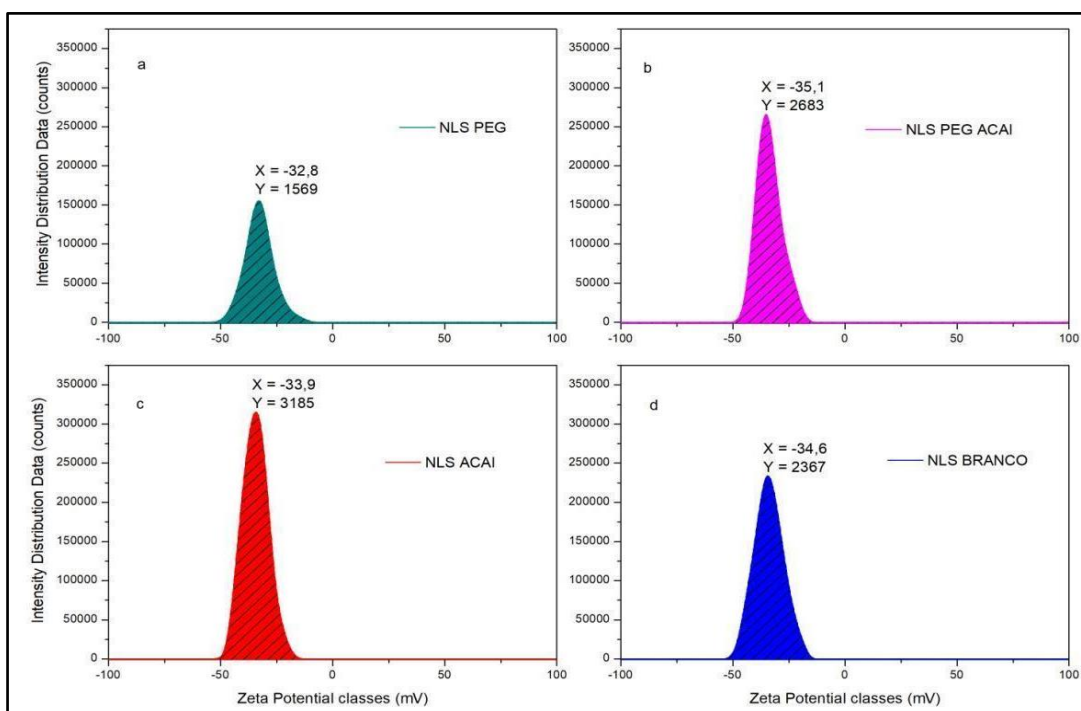


Figura 11. Valores de potencial Zeta para as formulações a) NLS-PEG – 32,8 mV, b) NLS-PEG-AÇAÍ – 35,1 mV, c) NLS-AÇAÍ – 33,9 mV, d) NLS- BRANCO – 34,6 mV.

4.1.2 Formulações de Copaíba

Para a formulação NLS-BR foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $112,83 \pm 1,35$ nm (figura 12), com um índice de polidispersividade médio de 0,209.

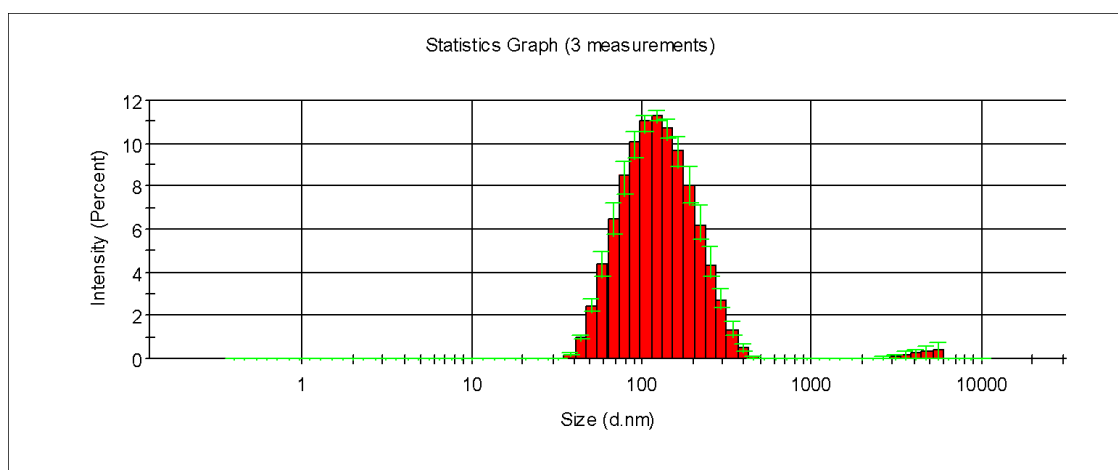


Figura 12. Tamanho médio e desvio padrão de $112,83 \pm 1,23$ nm obtido na formulação NLS-BR-COP.

Para a formulação NLS-COP foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $120,2 \pm 1,95$ nm (figura 13), com um índice de polidispersividade médio de 0,194.

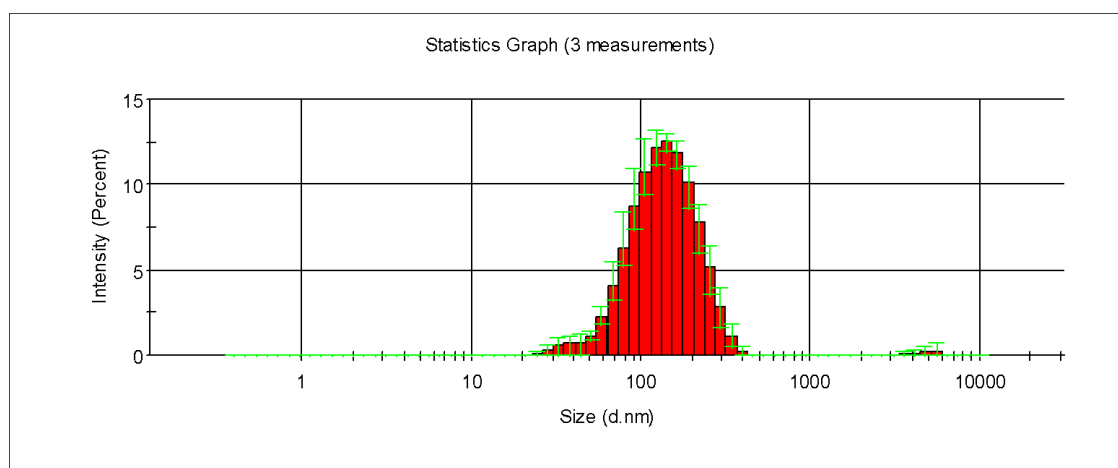


Figura 13. Tamanho médio de $120,2 \pm 1,95$ nm obtido na formulação NLS-COP.

Para a formulação NLS-PEG foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $116,4 \pm 1,54$ nm (figura 14), com um índice de polidispersividade médio de 0,178.

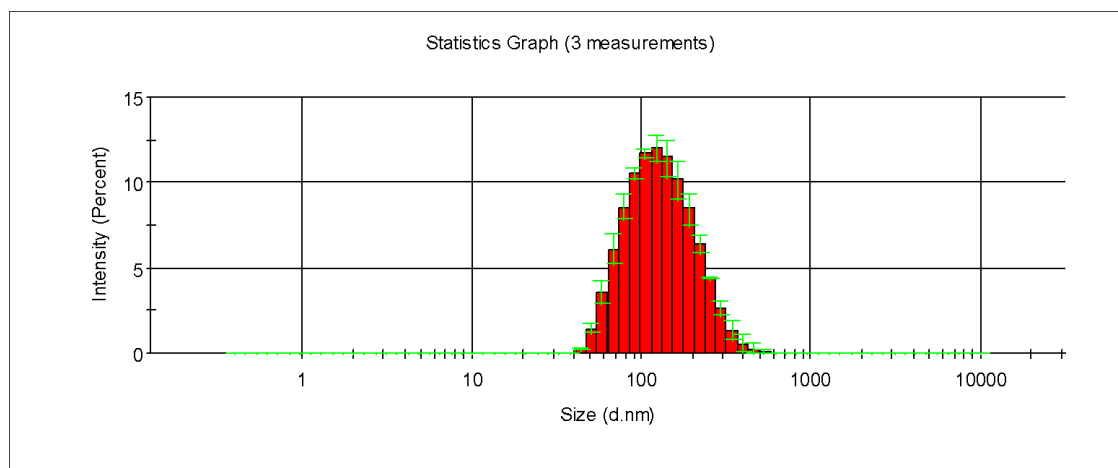


Figura 14. Tamanho médio de $116,4 \pm 1,54$ nm obtido na formulação NLS-PEG.

Para a formulação NLS-PEG-COP foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $115,1 \pm 1,51$ nm (figura 15), com um índice de polidispersividade médio de 0,234.

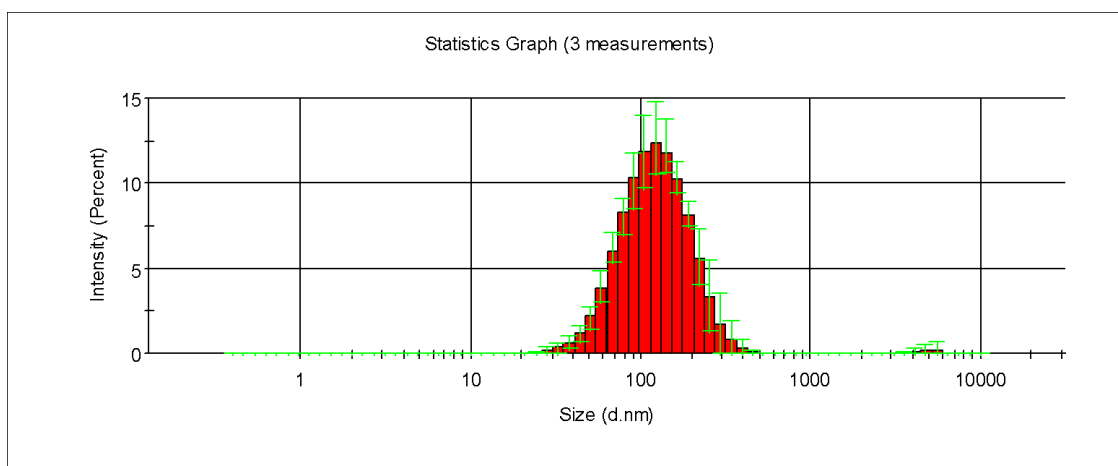


Figura 15. Tamanho médio de $115,1 \pm 1,51$ nm obtido na formulação NLS-PEG-COP.

Na figura 16 pode-se observar que os valores de potencial Zeta para as formulações de copaíba ficaram dentro da faixa dos $-42,3$ mV para as formulações NLS-BR. Para as formulações NLS-PEG o valor ficou em $-35,9$ mV, na formulação NLS-COP $-32,9$ mV e na formulação NLS-PEG-COP o valor obtido foi de $-37,4$ mV.

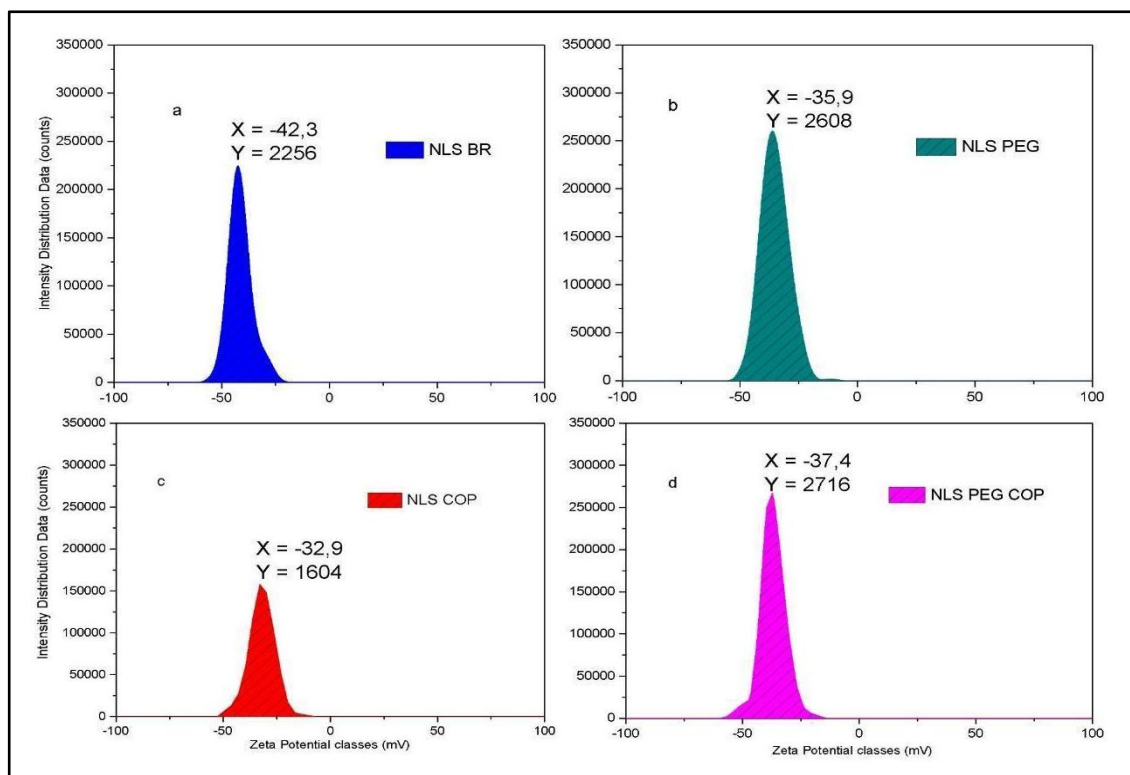


Figura 16. Valores de potencial Zeta para as formulações a) NLS-BR – $-42,3$ mV, b) NLS-PEG – $-35,9$ mV, c) NLS-COP – $-32,9$ mV, d) NLS-PEG-COP – $-37,4$ mV.

4.1.3 Formulações de Camu-Camu

Para a formulação NLS-BR foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $113,7 \pm 1,41$ nm (figura 17), com um índice de polidispersividade médio de 0,194.

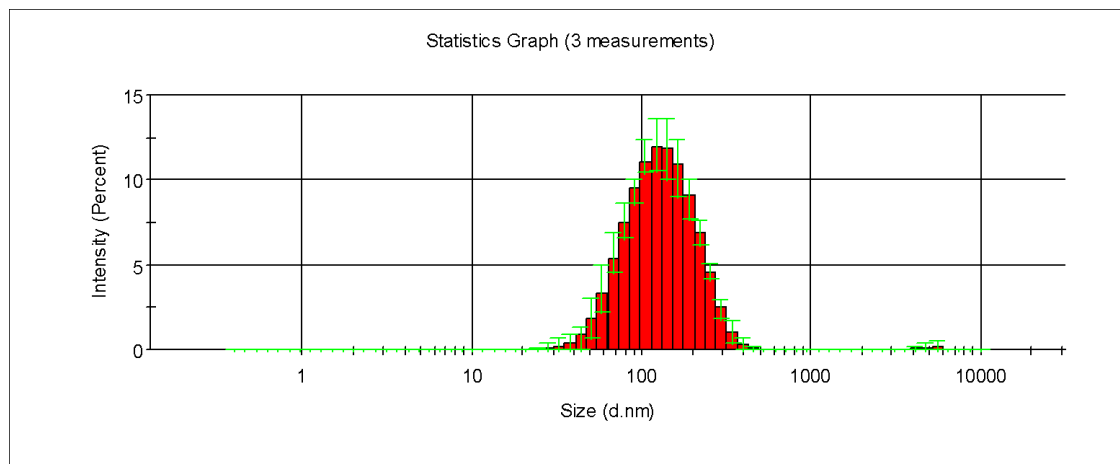


Figura 17. Tamanho médio de $115,1 \pm 1,41$ nm obtido na formulação NLS-BR.

Para a formulação NLS-CAMU foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $112,9 \pm 1,31$ nm (figura 18), com um índice de polidispersividade médio de 0,202.

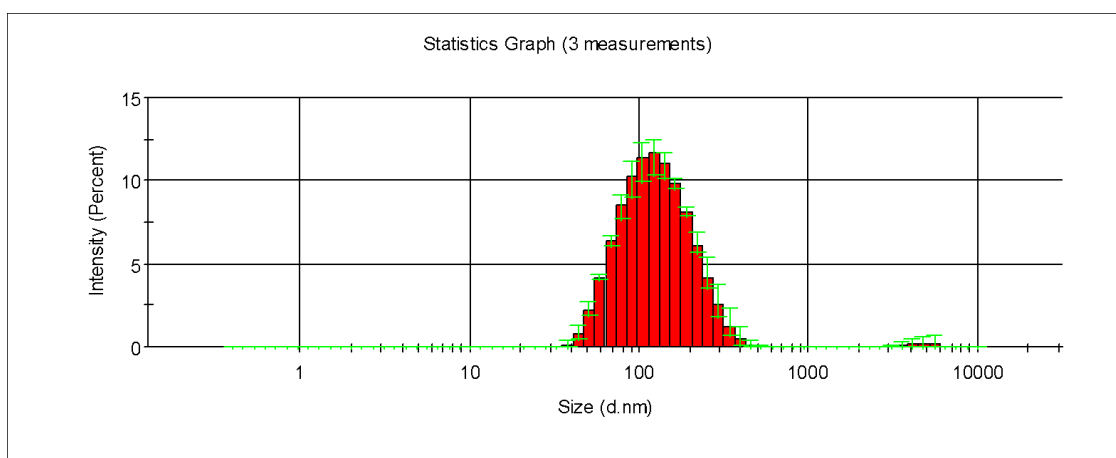


Figura 18. Tamanho médio de $115,1 \pm 1,31$ nm obtido na formulação NLS-CAMU.

Para a formulação NLS-PEG foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $117,5 \pm 1,81$ nm (figura 19), com um índice de polidispersividade médio de 0,219.

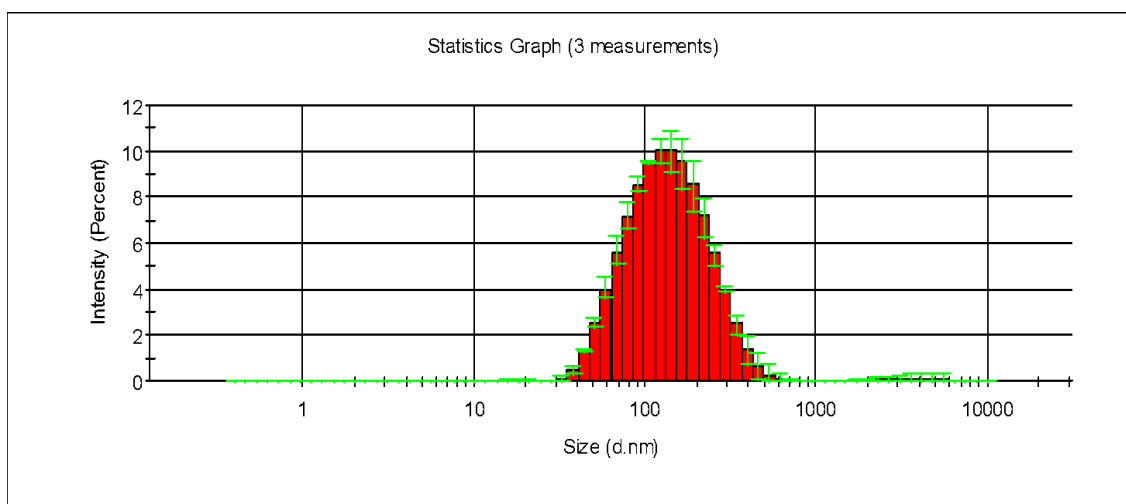


Figura 19. Tamanho médio de $117,5 \pm 1,81$ nm obtido na formulação NLS-PEG.

Para a formulação NLS-PEG-CAMU foram obtidas nanopartículas com tamanho médio e desvio padrão de $115,6 \pm 1,54$ nm (figura 20), com um índice de polidispersividade médio de 0,197.

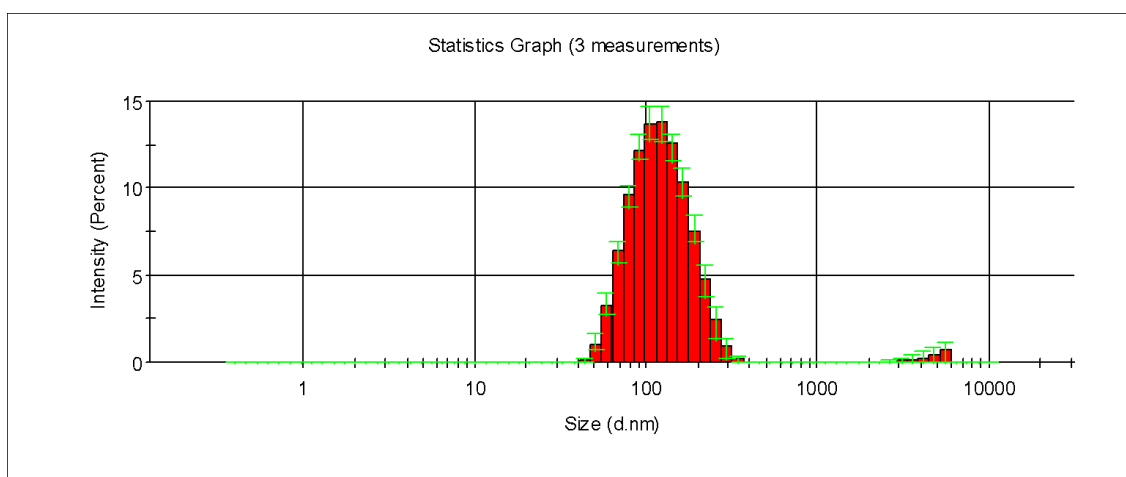


Figura 20. Tamanho médio de $115,6 \pm 1,54$ nm obtido na formulação NLS-PEG.

Na figura 21 pode-se observar que os valores de potencial Zeta para as formulações de camu-camu ficaram dentro da faixa dos -36 mV para as formulações NLS-BR; para as formulações NLS-PEG o valor ficou em -34,1 mV. Na formulação NLS-CAMU -32,3 mV e na formulação NLS-PEG-CAMU o valor obtido foi de -35,8 mV.

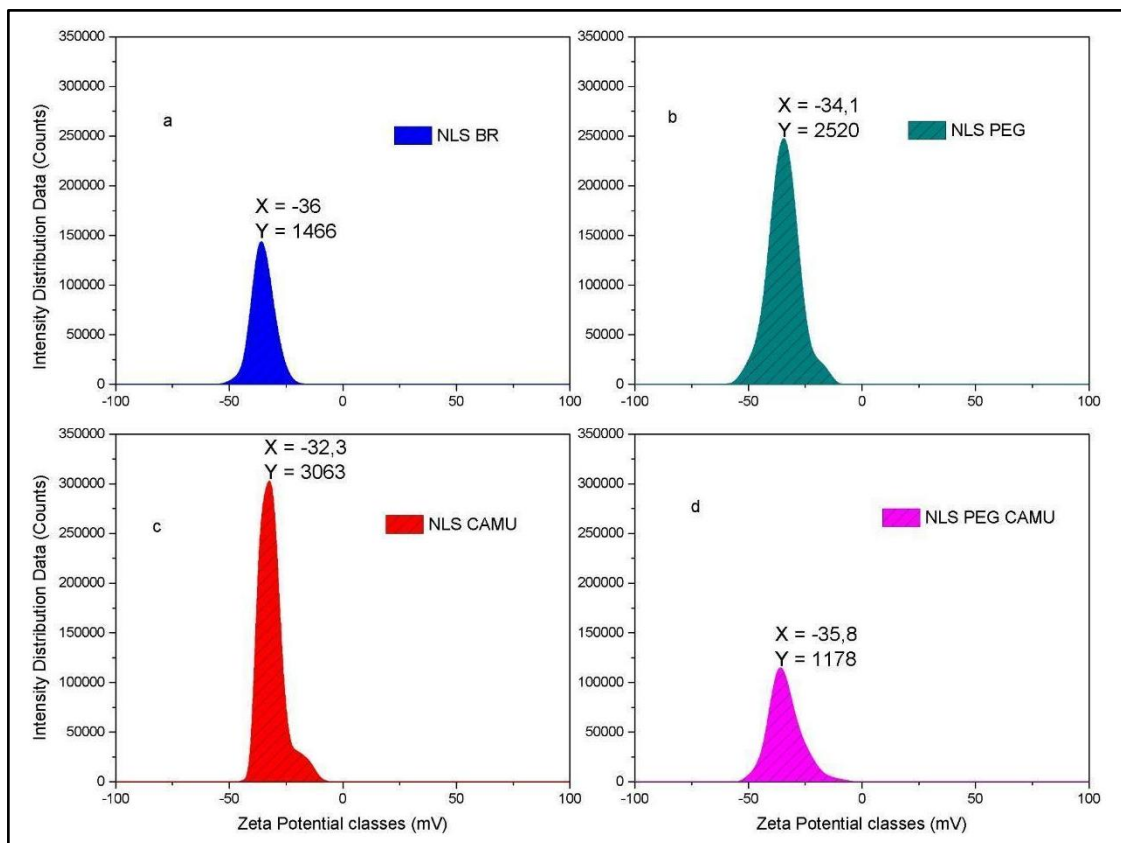


Figura 21. Valores de potencial Zeta para as formulações de Camu-Camu a) NLS-BR -36 mV, b) NLS-PEG - 34,1 mV, c) NLS-Camu -32,3 mV, d) NLS- PEG-CAMU - 35,8 Mv.

Os resultados obtidos referentes aos tamanhos das NLS presentes nas formulações estão de acordo com o esperado para técnica de cisalhamento e ultrassom utilizada para a obtenção das NLS com tamanho nanométrico, empregando o cupuaçu como matéria prima (Ramos, 2017).

O tamanho médio das nanopartículas das formulações de Açaí foi de 112,72 nm com índice de polidispersividade de 0,182 e potencial zeta -34,1 mV. A formulação contendo o extrato de copaíba apresentou um tamanho médio de nanopartícula na formulação de 116,13 nm com um índice de polidispersividade de 0,203 e um potencial Zeta de -37,1 mV. A formulação contendo o extrato do camu-camu apresentou um tamanho médio de nanopartícula de 119,8 nm com um índice de polidispersividade 0,203 e um potencial Zeta de -34,55 mV.

No padrão monomodal apresentado pelas figuras 7,8,9,10,12,13,14,15,17,18,19,20 fica evidente que as amostras não apresentam agregados e há homogeneidade, que é corroborado pelos baixos índices de polidispersividade em torno de 0,2. Valores de PDI próximos de 1 caracterizam uma amostra heterogênea, enquanto que valores próximos de 0 mostram uniformidade da formulação (STETEFELD *et al.*, 2016).

Os valores do potencial Zeta são determinantes para que o sistema coloidal permaneça em equilíbrio termodinâmico. Esta estabilidade é conferida pela repulsão elétrica das superfícies com cargas semelhantes, e quanto maior for o potencial de repulsão, maior será a estabilidade do sistema e menor a possibilidade de coalescência de sistemas coloidais (Karmakar, 2019).

As formulações de açaí, copaíba e camu-camu apresentaram valores médios de -34,1, -37,1 e -34,5 mV, respectivamente, indicando boa estabilidade das formulações. Quanto mais distantes de 0 o valor do potencial Zeta (ζ) tanto para valores positivos (+), quanto para valores negativos (-), maior a tendência de estabilidade do sistema (Malvern, 2014).

4.2 Influência da peglação

Foram avaliadas 22 formulações, destas 11 contendo PEG (+), outras 11 sem adição do polímero (-). O raio hidrodinâmico (tamanho) médio apresentado pelas formulações sem a adição de PEG foi de 130,45 nm e para as formulações com a adição de PEG o tamanho médio foi de 111,91 nm.

Estes valores indicam que as formulações que receberam o polímero obtiveram um tamanho médio menor em relação às formulações que não receberam o polímero, dada a capacidade do PEG de recobrir, estabilizar e reduzir a agregação em soluções aquosas (PRAMUAL *et al.*, 2017).

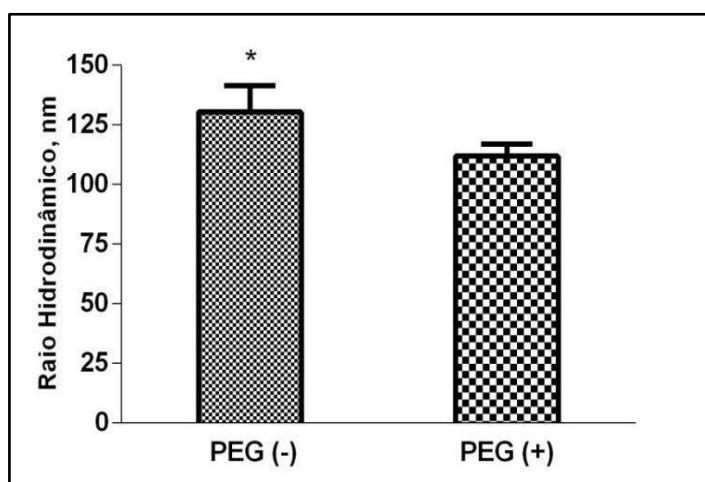


Figura 22. Tamanho médio das formulações sem (-) e com (+) adição de polietilenoglicol PEG. * indica diferença significativa pelo teste T ($p < 0,05$).

O índice de polidispersividade PDI médio apresentado pelas formulações de sem adição de polímero foi de 0,200, enquanto que nas formulações que foram adicionados polímero o PDI médio foi de 0,203 figura 23. O valor apresentado pelas NLS indica que as amostras não possuem agregados e há homogeneidade nas formulações, valores de PDI próximos de 1 caracterizam uma amostra heterogênea, enquanto que valores próximos de 0 mostram uniformidade da formulação (STETEFELD, 2016).

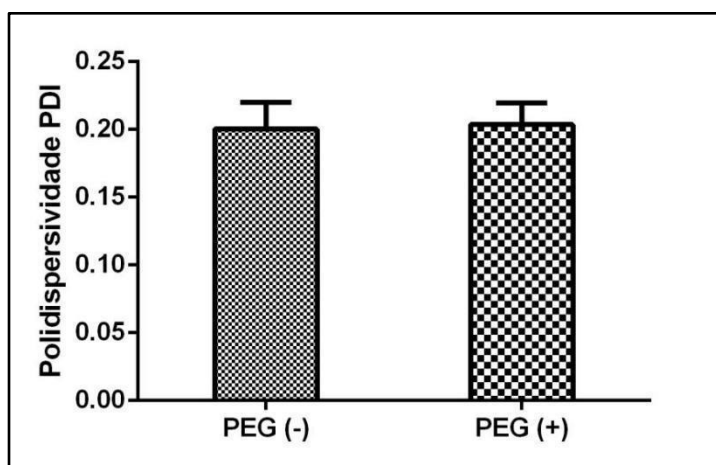


Figura 23. Índice de polidispersividade (PDI) médio das formulações sem (-) e com (+) adição de polietilenoglicol PEG. Não houve diferença significativa pelo teste T ($p < 0,05$).

A PEGlação das formulações mostrou-se capaz de influenciar significativamente no tamanho médio final das NLS, sendo que as formulações que foram tratadas com a adição de PEG apresentaram um tamanho médio de 111,91 nm, já as formulações que não tiveram PEG acrescentadas na fase aquosa apresentaram um tamanho médio de 130,45nm.

O índice de polidispersividade das formulações não apresentou diferença significativa pelo Teste T em relação à adição de PEG, com valores médios semelhantes de 0,2. Dessa forma, pode-se verificar que a adição do polímero polietileno glicol na síntese de NLS a partir da manteiga de Cupuaçu, influencia no tamanho médio das nanopartículas, mas não interfere na homogeneidade das formulações.

4.3 Estabilidade das Formulações

As formulações apresentaram uma estabilidade coloidal para o sistema nanoemulsionado obtido, uma vez que a energia repulsiva das nanopartículas foi suficiente para a manutenção da estabilidade das amostras desde sua síntese, seguindo por leituras em diversos

tempos (Figura 24). Os valores médios das formulações ficaram menores que -20 mV, indicando que as formulações apresentam boa estabilidade cinética (NEGI *et al.*, 2013).

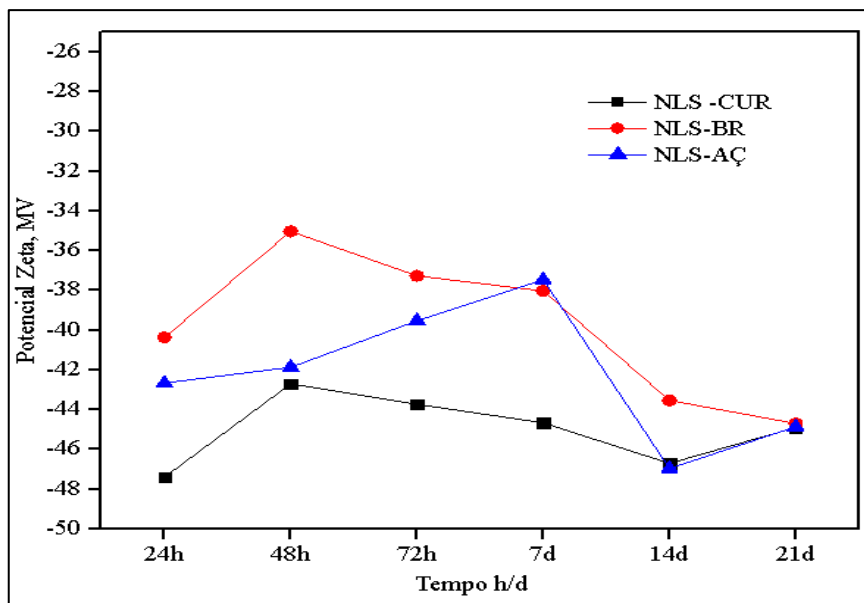


Figura 24. Potencial zeta médio para as formulações NLS-CUR, NLS-AÇAÍ e NLS- BR em função do tempo de armazenamento.

4.4 Medidas Espectroscópicas

As medidas espectroscópicas mostraram que a absortividade molecular das formulações não é caracterizada por um pico específico na região do espectro entre 800 nm e 300 nm, apenas por um aumento constante na absorbância quando as leituras das amostras passam para o nível do UV-Vis (Figura 21).

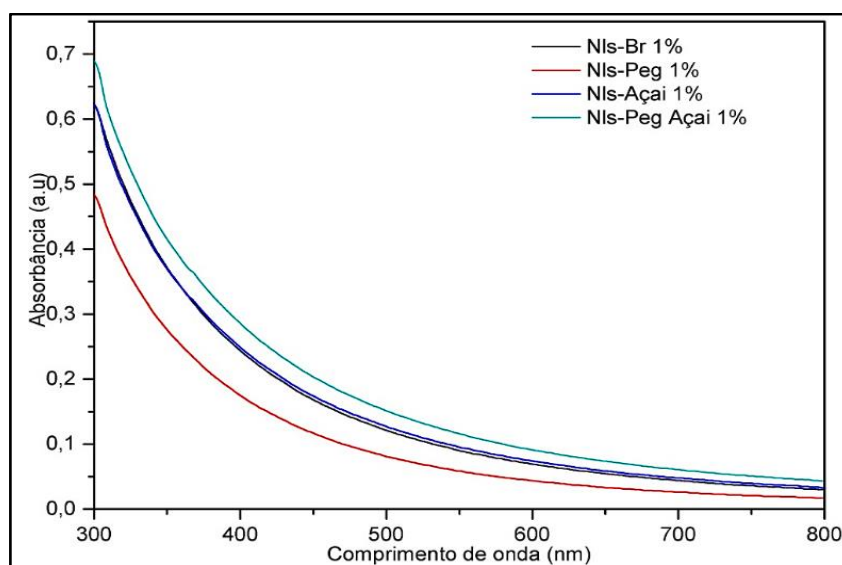


Figura 25. Espectros de absorbância para as formulações NLS-PEG, NLS-PEG-AÇAÍ, NLS-AÇAÍ, NLS- BR.

Já na figura 25, no espectro de absorção do açaí, fica evidente a absorbância na região de 510 e 520 nm que corresponde à absorção da antocianina da polpa do açaí (ALBARICI e PESSOA, 2012).

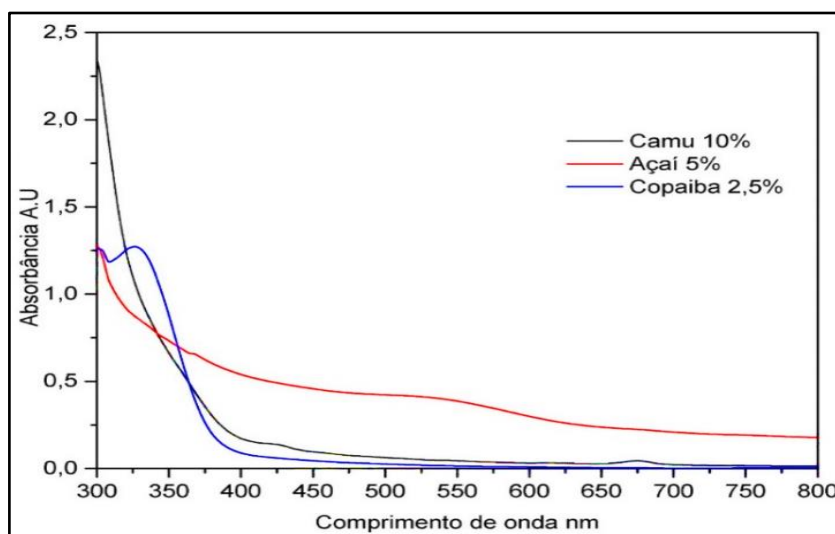


Figura 26. Espectros de absorbância em meio aquoso do extrato de camu-camu, polpa do açaí e extrato de copaíba.

Os espectros de absorção de luz mostraram que nas formulações apresentam aumentada absorbância desde o ponto inicial da leitura espectral devido à natureza coloidal da amostra, o que acaba por sobrepor outras bandas de absorção em comprimentos de onda de maior energia como observado para outras formulações de açaí (MONGE-FUENTES *et al.*, 2017).

Os extratos apresentaram picos de absorção em regiões distintas, como citado acima, no extrato da polpa de açaí que possui antocianinas em sua composição essa classe de moléculas fica evidente na região dos 520 nm. O extrato de camu-camu apresenta picos na região de 670 nm e 420 nm, que podem estar relacionados a resíduos de clorofila das folhas (FALCO *et al.*, 2014).

O extrato de copaíba apresenta um pronunciado pico de absorbância em 325 nm, este pico carece ainda de relação com o tipo de molécula absorvente visto que esta região do espectro é de maior energia e uma grande variedade de grupos funcionais como polifenóis que podem estar presentes absorvendo radiação (LIKHANOV, 2014).

4.5 Medidas fluorimétricas

Na avaliação da capacidade dos extratos e formulações estudados apresentaram eventos luminescentes na forma de fluorescência, as amostras foram excitadas numa faixa de 400 a 500 nm. Foram avaliados picos de emissão máximos obtidos pelas amostras, de acordo com o que se pode ver na figura 27, pode-se observar os picos de emissão apresentados pelo extrato do açaí (a), camu-camu (b) e copaíba (c).

Os picos máximos de fluorescência observados para o extrato da polpa de açaí foi de 674,5 nm quando excitado em 410 nm, intensidades de fluorescência menores são observadas para outros comprimentos de onda menores com exceção da excitação em 400 nm (figura 27-a).

O extrato de copaíba apresentou pico de fluorescência máximo em 675,8 nm quando excitado em 420 nm, foram observados também intensidades de fluorescência menores em diferentes comprimentos de excitação, mesmo que de maior energia (figura 27-b).

Para o extrato de camu-camu foi observado um pico de fluorescência máximo em 679,2 nm quando excitado em 420 nm, e muito similar com 410 nm, igualmente intensidades diferentes menores ou maiores energeticamente foram observados picos menos fluorescentes (figura 26-c).

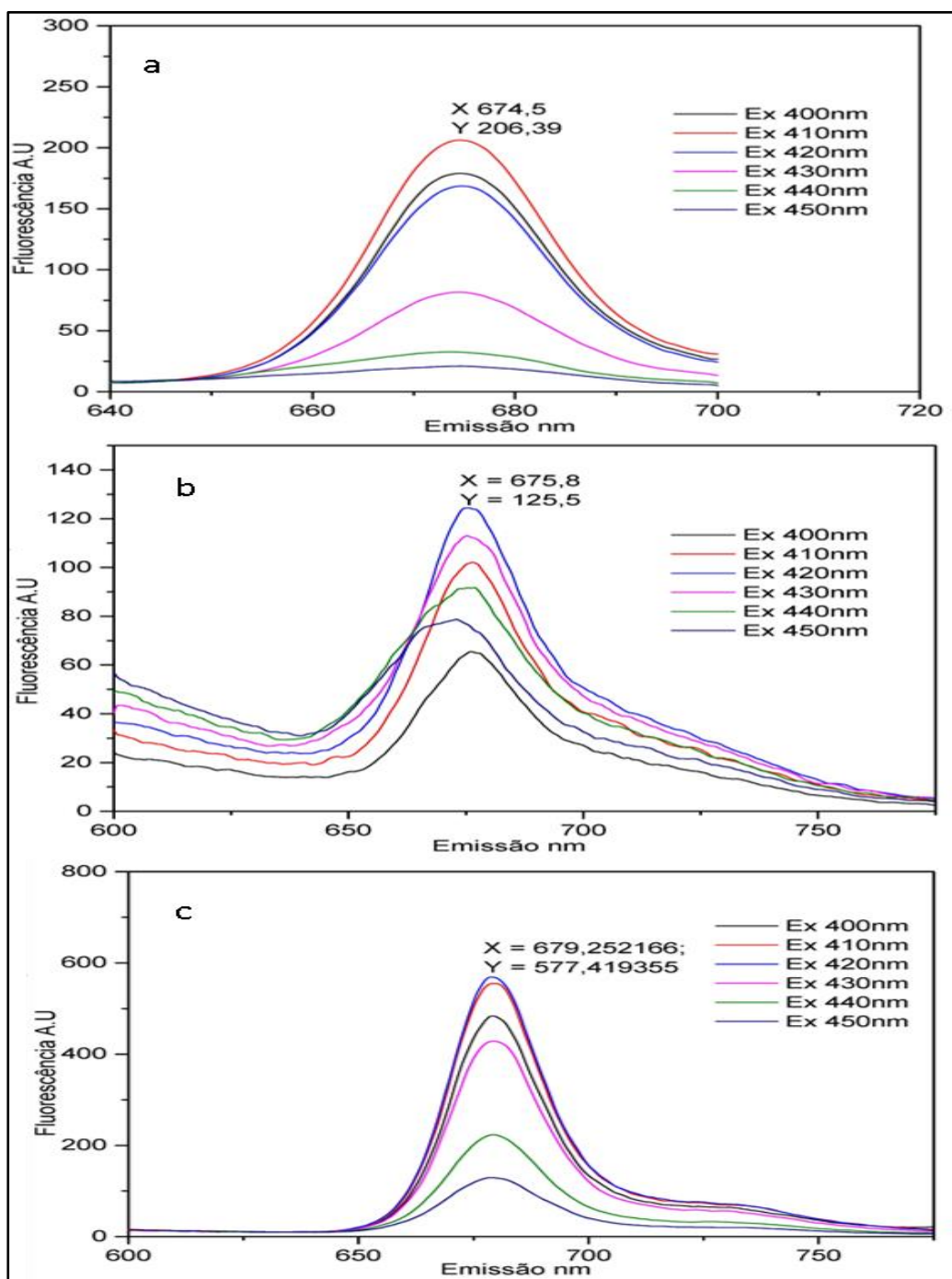


Figura 27. Espectros de fluorescência em meio aquoso do extrato da polpa do açai (a), extrato de copaíba (b) e extrato de camu-camu (c).

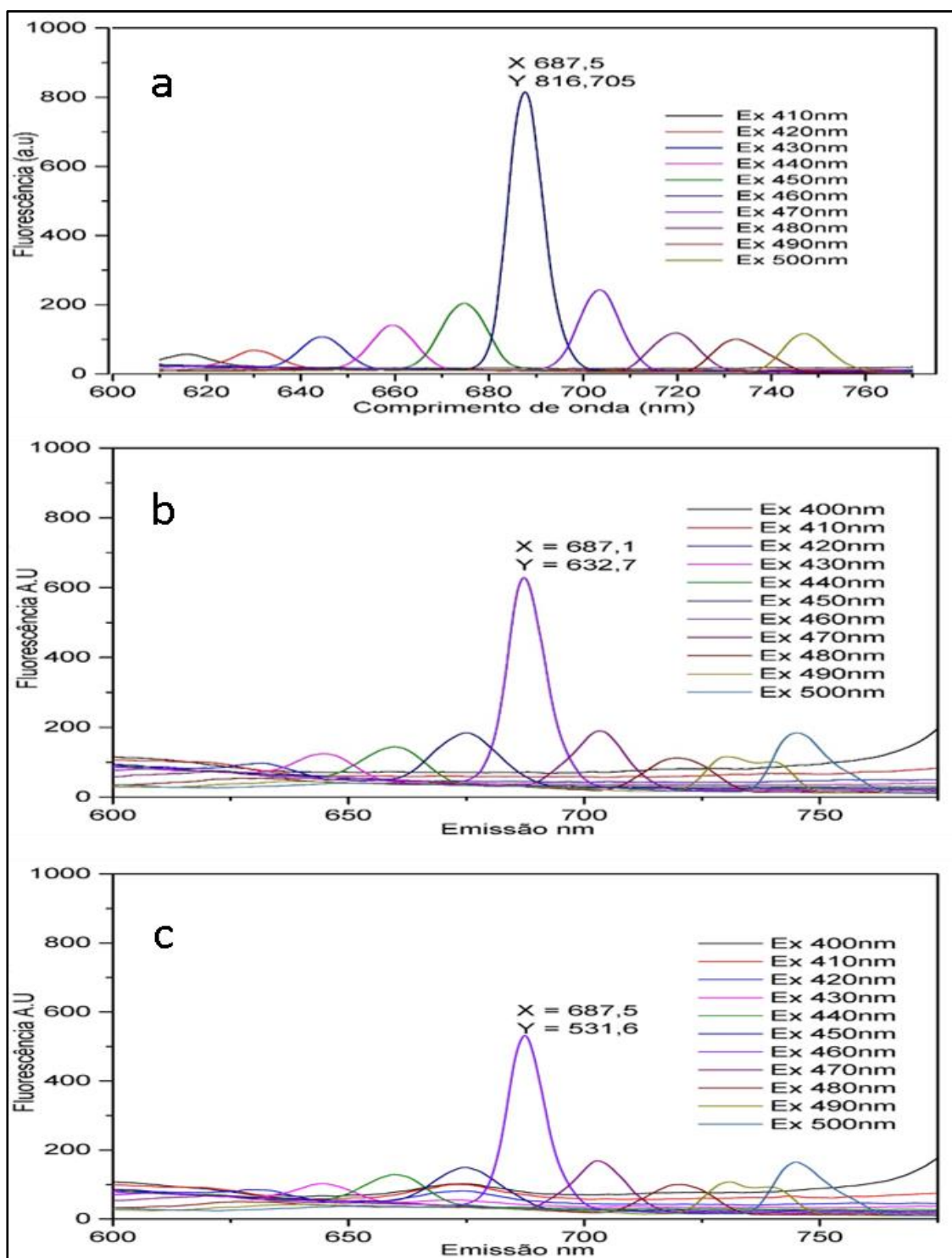


Figura 28. Espectros de Fluorescência das formulações NLS (a) açai , (b) NLS cop e (c) NLS camu.

As formulações apresentaram um comportamento espectral semelhante ao serem excitadas nos comprimentos de onda de 400 – 500 nm. Um pico de maior intensidade é observado em 687 nm quando as amostras são excitadas em 460 nm (Figura 28).

Os picos observados apresentaram fluorescência de emissão em 687 nm, um comprimento de onda maior do que foi observado para os extratos. Esta similaridade de

fluorescência observada pode ser de natureza coloidal da amostra que semelhantemente aos espectros de absorção (figura 26) que pode sobrepor a fluorescência dos extratos. Outra possibilidade é a supressão da emissão de fluorescência pela interação com um supressor, podendo ser um processo dinâmico ou estático (Rocha *et al.*, 2019).

A fluorescência observada nas formulações em 687 nm está na região infravermelha do espectro, que pode ser característica de lipídios que apresentam cadeia linear de hidrocarbonetos conjugados por ligações duplas (Kuerschner *et al.*, 2005).

4.6 Medidas de Geração de Espécies Reativas de Oxigênio (EROS)

As espécies reativas de oxigênio são um indicador que o FS foi excitado e produziu íons radicalares (EROS). Os extratos e as formulações foram irradiadas por luz azul em 470 nm e vermelho em 624 nm, com o auxílio de um fotoreator (Figura 29).



Figura 29. Irradiação das amostras com LED azul em 470 nm e LED vermelho em 624 nm.

Na irradiação da amostra NLS-BR com LED vermelho, não foi observada redução da absorbância em 417 nm, mediado pelo DBPF no tempo total de 60s, figura 30.

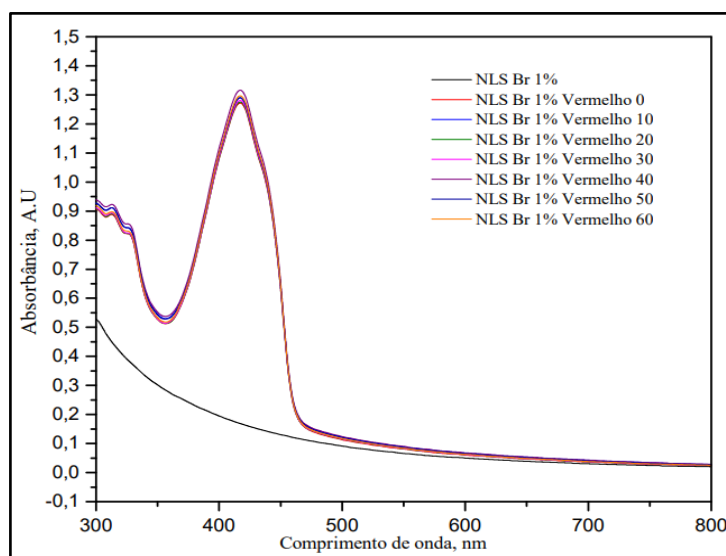


Figura 30. Irradiação da amostra NLS-BR com LED vermelho em 624 nm, em intervalos de 10 s por 1 minuto.

A ausência do rebaixamento da absorvância também foi observada na formulação NLS-AÇ, quando irradiada com LED vermelho por igual período de 60s, figura 31.

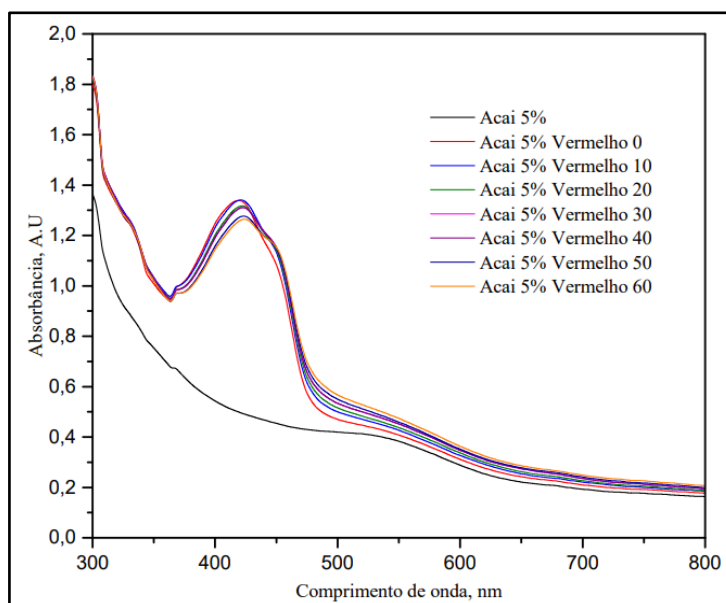


Figura 31. Irradiação da amostra NLS-AÇ com LED vermelho em 624 nm, em intervalos de 10 s por 1 minuto.

Na figura 32 temos os espectros de decomposição do (DPBF) quando irradiados por LED azul de 470 nm, para o extrato de Camu-Camu e a formulação NLS – CA.

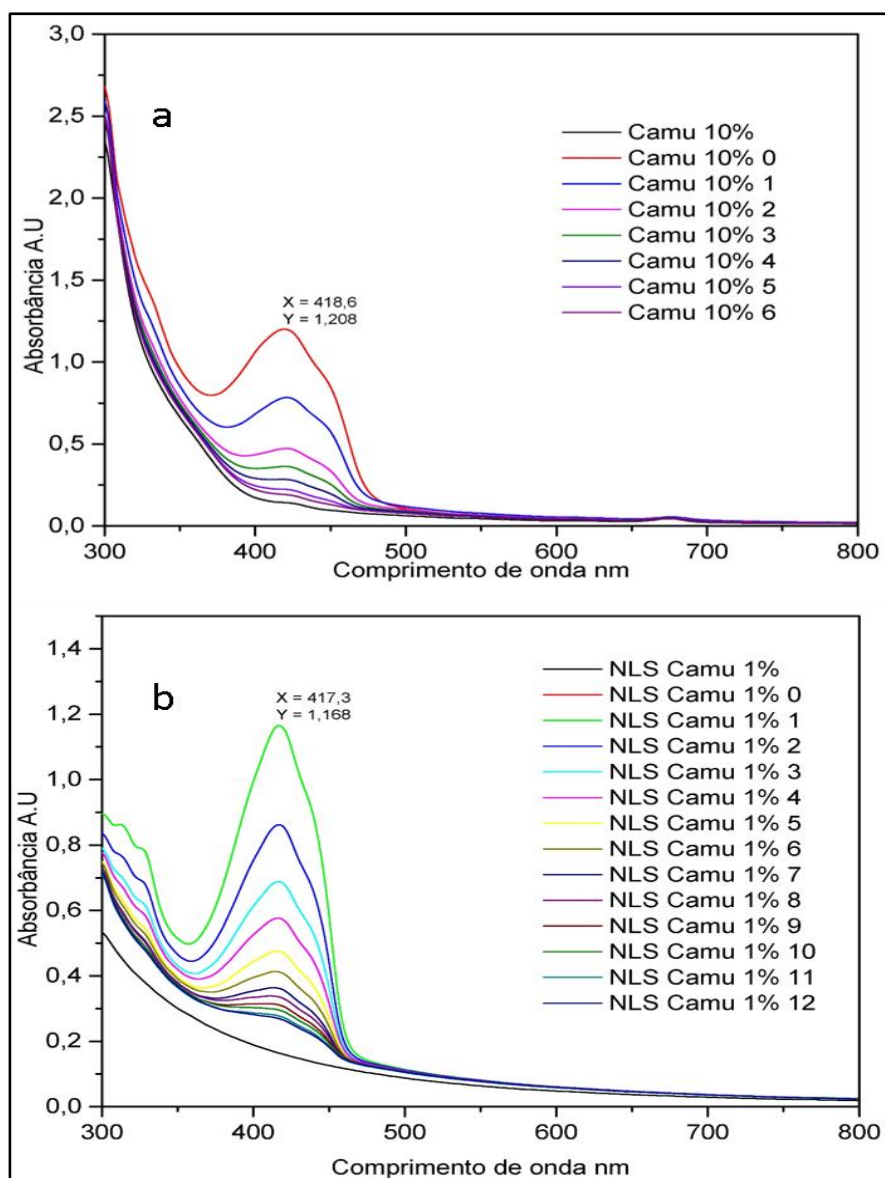


Figura 32. Espectros de Absorbância de degradação do DPBF frente ao extrato de Camu-Camu (a) e a formulação NLS-Camu (b) sob luz azul 470 nm em diferentes tempos.

Na figura 33. temos os espectros de decomposição do (DPBF) quando irradiados por LED azul de 470 nm para o extrato de açai e a formulação NLS – AÇ.

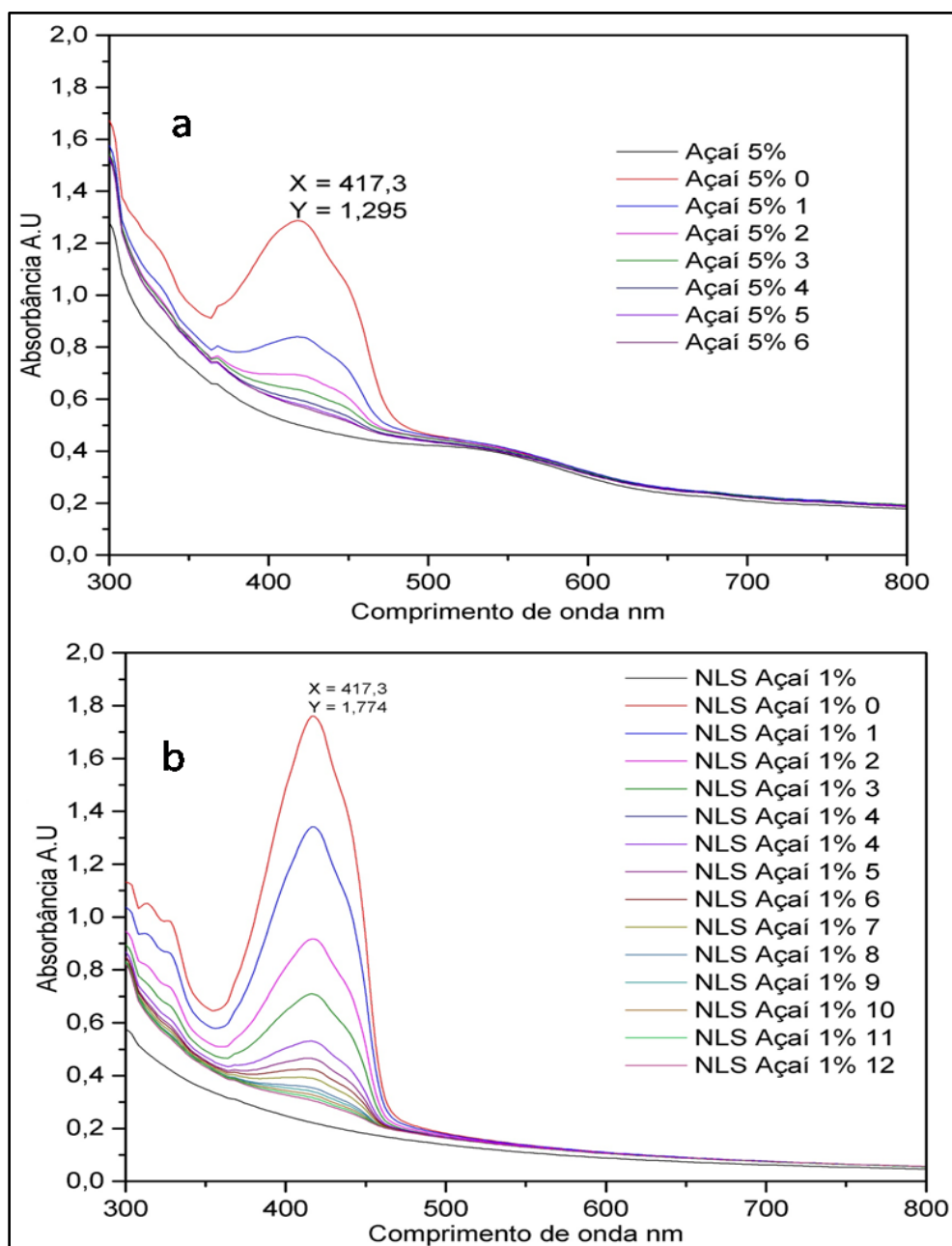


Figura 33. Espectros de Absorbância de degradação do DPBF frente ao extrato da polpa de Açaí (a) e a formulação NLS-Açaí (b) sob luz azul 470 nm em diferentes tempos.

Pela observação dos espectros de decomposição do DPBF fica evidente que a velocidade da reação é mais lenta quando o extrato está incorporado à formulação e mais rápida quando o extrato se encontra na forma livre. Este aumento do tempo de liberação do seu conteúdo é uma das características encontradas em carreadores lipídicos como as NLS para uso em TFD (Lima *et al.*, 2013).

4.7 Medidas calorimétricas

Nas análises calorimétricas demonstraram que as formulações apresentaram um comportamento térmico semelhante para a termogravimetria (TG) e para Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC). Na figura 34, pode-se verificar uma perda de massa com valores muito próximos obtidos por TG para as formulações analisadas.

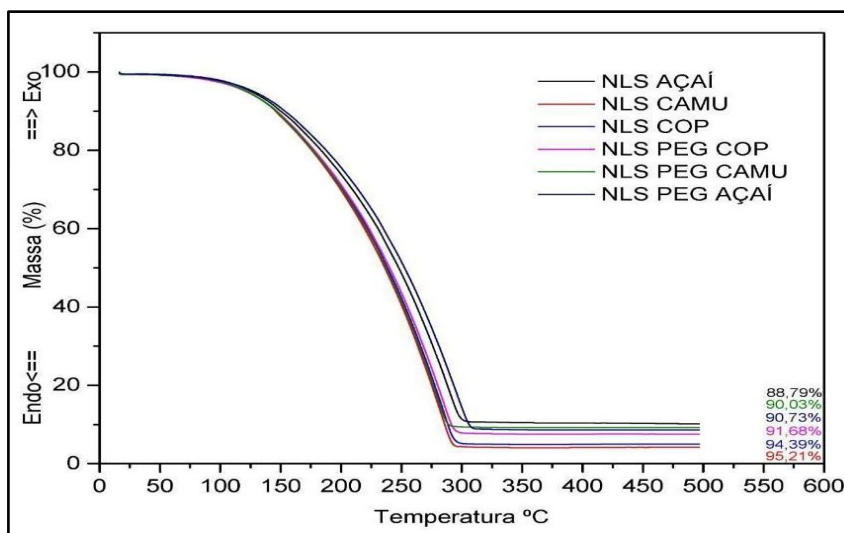


Figura 34. Termograma (TG) da perda de massa das formulações estudadas em relação ao aumento da temperatura.

Na figura 35 temos os picos característicos dos eventos endotérmicos obtidos por meio da análise de DSC para as formulações avaliadas.

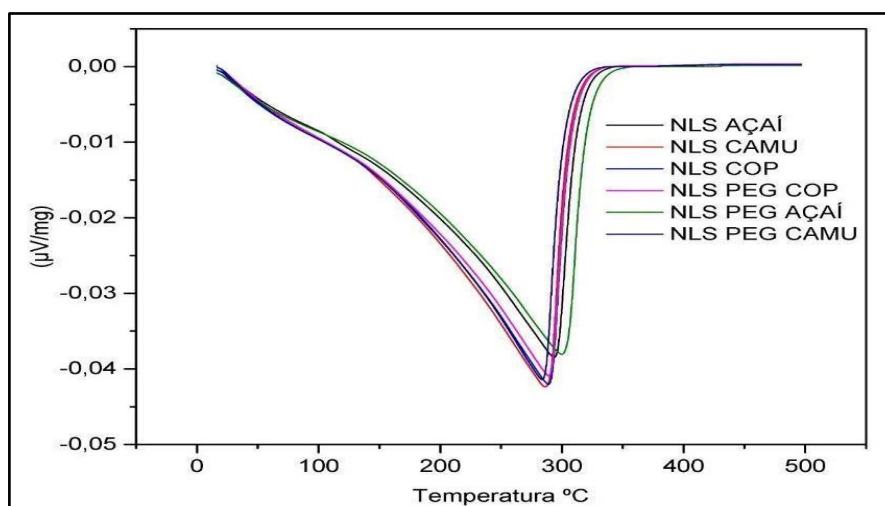


Figura 35. Termograma (DSC) picos característicos dos eventos endotérmicos apresentados pelas formulações estudadas em relação ao aumento da temperatura.

As análises térmicas servem para obter informações sobre as propriedades físicas e energéticas de amostras estudadas. Na figura 34 vemos que o aquecimento das amostras a partir de 25 °C até a temperatura final de 500 °C ocasiona uma perda elevada de massa. Para a

formulação NLS a redução na massa foi do açaí de 88,79%, NLS PEG Açaí 90, 73%, NLS Camu 95,21%, NLS PEG Camu 90,03% e NLS cop 94,39%, NLS PEG Cop 91,68%.

A figura 35 mostra os eventos de DSC endotérmicos que ocorreram nas formulações, sendo percebidos já no início do aquecimento onde a fase lipídica é fusionada, continuando até a evaporação da fase aquosa e encerrando na carbonização do material restante em 298 °C.

4.8 Imagens de microscopia eletrônica de varredura

As imagens de microscopia de varredura corroboram a predominância do formato esférico das NLS que compõem as formulações. Na figura 36 pode-se observar o tamanho médio inferior a 200 nm.

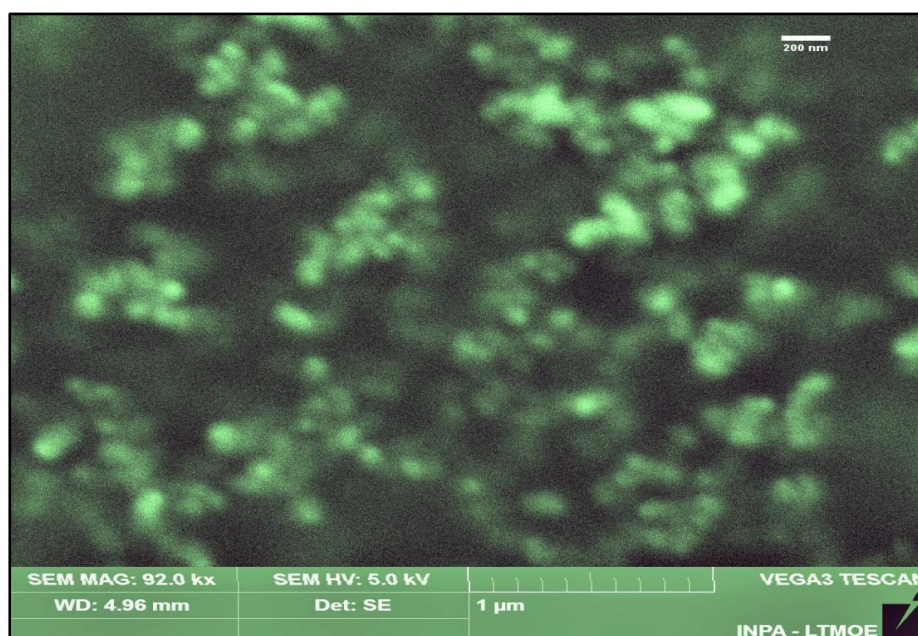


Figura 36. Microscopia eletrônica de varredura - MEV da formulação NLS-BR, evidenciando o formato esférico das NLS.

4.9 Viabilidade celular

Na figura 37 pode-se observar a viabilidade das células in vitro em função do tempo, é possível verificar que nas primeiras 24 h de incubação houve uma diminuição média significativa da viabilidade para as três formulações quando comparado a 100% do meio controle.

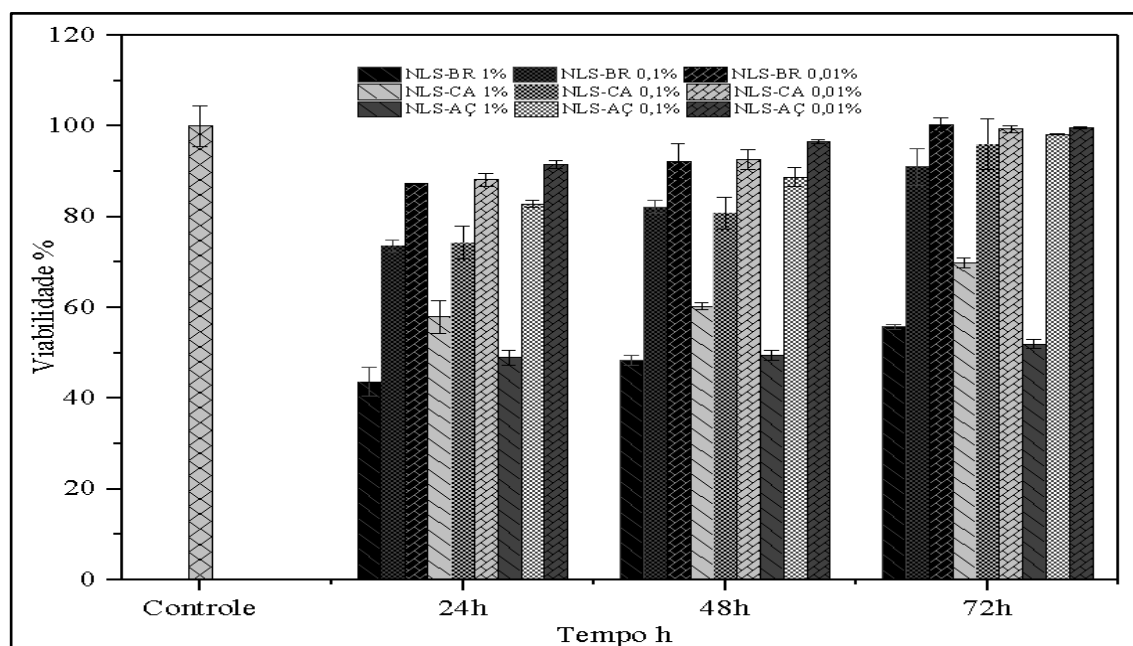


Figura 37. Gráfico de médias da viabilidade celular em 24, 48 e 72 h. Mostra o aumento da viabilidade celular em função do tempo.

Quando comparadas individualmente (figura 38) as formulações, fica evidenciada a citotoxicidade aumentada logo no início do teste, nas NLS-BR, NLS- AÇ, NLS-CA 1%, 0,1% e 0,01% quando comparado a 100% do meio controle.

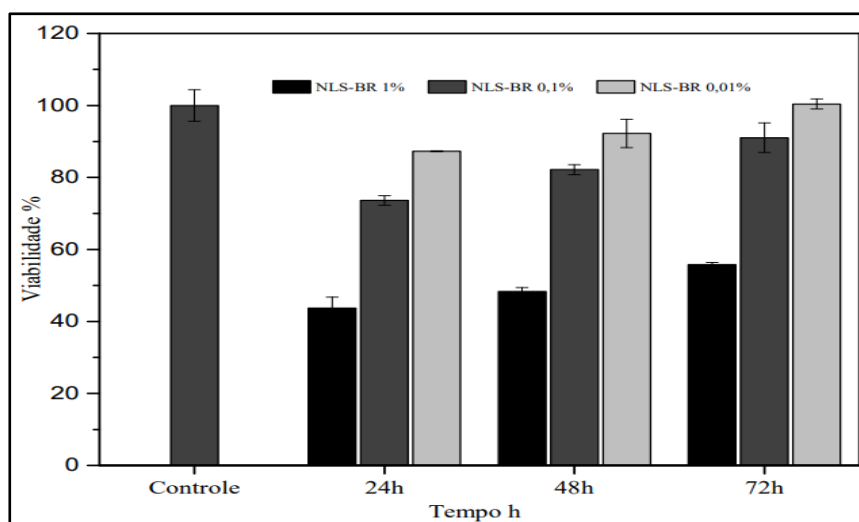


Figura 38. Gráfico de médias da viabilidade da formulação NLS-BR celular em 24, 48 e 72 h.

Na avaliação da viabilidade celular média em 48 h (figura 39) nota-se uma melhora significativa no número de células viáveis nas concentrações de 0,1% para as três formulações.

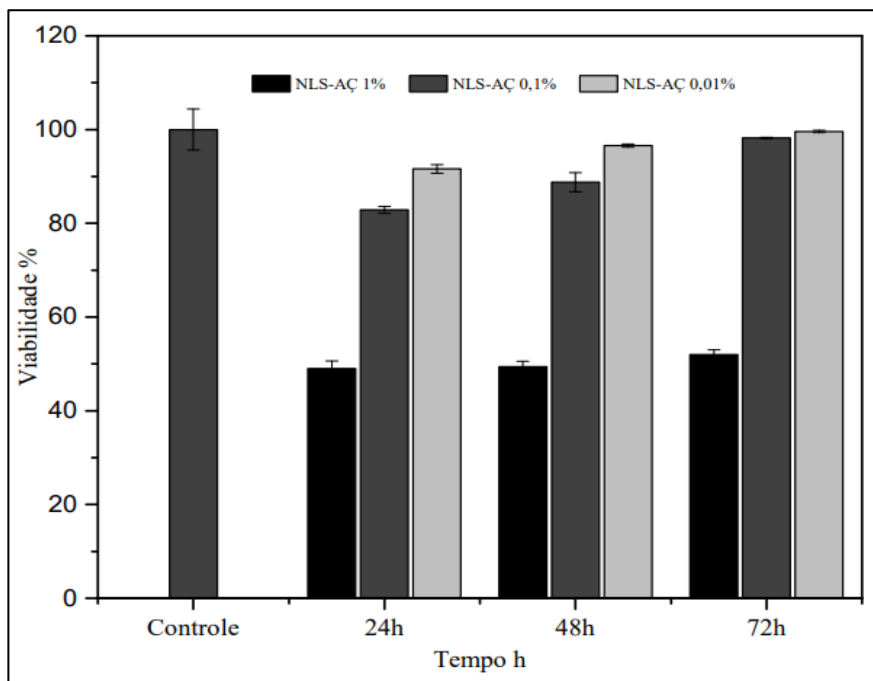


Figura 39. Gráfico de médias da viabilidade da formulação NLS-AÇ celular em 24, 48 e 72h

No tempo de 72 h, (figura 40) a viabilidade se mantém para as concentrações de 0,01%, em todas as formulações.

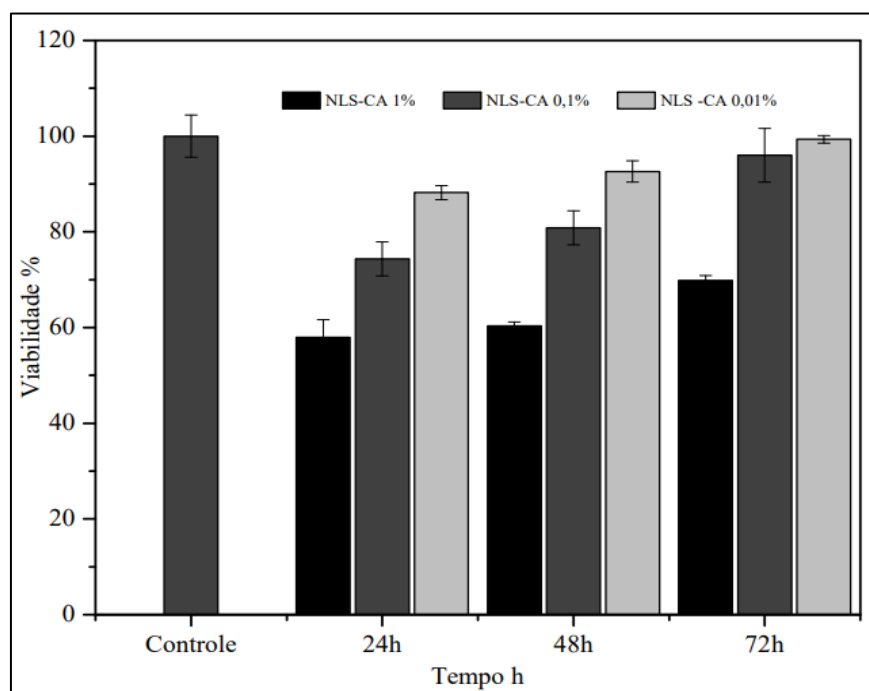


Figura 40. Gráfico de médias da viabilidade da formulação NLS-CA celular em 24, 48 e 72h.

Tabela 3. Valores médios e desvio padrão da viabilidade das formulações em 24, 48 e 72 h. Valores seguidos de * não diferem em relação ao controle com significância de 5% pelo teste de Tukey.

VIABILIDADE DAS FORMULAÇÕES %	24 h	48 h	72 h
	MÉDIA E DESVIO PADRÃO		
NLS - BR 1%	43,69 ± 3,08	73,61 ± 1,03	87,29 ± 0,14
NLS - BR 0,1%	48,35 ± 1,06	82,18 ± 1,38	92,24 ± 3,95
NLS - BR 0,01%	55,78 ± 0,58	91,03 ± 4,1	100,40 ± 1,37*
NLS - AÇ 1%	48,97 ± 1,68	82,85 ± 0,75	96,61 ± 0,90
NLS - AÇ 0,1%	49,42 ± 1,12	88,78 ± 2,01	96,05 ± 0,36
NLS - AÇ 0,01%	51,96 ± 1,04	98,19 ± 0,13*	99,05 ± 0,23*
NLS - CA 1%	57,93 ± 3,68	74,34 ± 3,52	88,18 ± 1,49
NLS - CA 0,1%	60,31 ± 0,84	80,84 ± 3,56	92,62 ± 2,20
NLS - CA 0,01%	69,87 ± 1,02	96,01 ± 5,63	99,35 ± 0,7*

A baixa viabilidade das formulações pode ser atribuída aos componentes tensoativos das formulações, que podem apresentar alguma toxicidade às células em relação a outros tipos de tensoativos, mesmo com o tensoativo estando presente em baixas concentrações (MÜLLER et al., 1997).

A viabilidade tende a melhorar conforme o período de incubação aumenta (ARECHABALA *et al.*, 1999), um aumento significativo é observado nas formulações que contém o extrato de camu camu e açaí, plantas com reconhecidas propriedades anti-oxidantes (INOUE et al., 2008; CEDRIM et al., 2018).

Algumas das formulações que foram pegladas apresentaram uma toxicidade ligeiramente maior quando comparadas às formulações que não tiveram adição de polímero, tabela 3.

Tabela 4. Valores médios e desvio padrão da viabilidade das formulações com PEG em 24, 48 e 72 h. Valores seguidos de * não diferem em relação ao controle com significância de 5% pelo teste de Tukey.

VIABILIDADE DAS FORMULAÇÕES PEG %	24 h	48 h	72 h
	MÉDIA E DESVIO PADRÃO		
NLS PEG - BR 1%	48,17 ± 0,96	61,77 ± 0,53	83,49 ± 6,13
NLS PEG - BR 0,1%	50,81 ± 0,98	81,57 ± 2,9	88,54 ± 1,36
NLS PEG - BR 0,01%	57,64 ± 1,73	87,28 ± 1,32	96,70 ± 0,55
NLS PEG - AÇ 1%	55,87 ± 3,90	74,65 ± 2,05	91,99 ± 0,24
NLS PEG - AÇ 0,1%	64,26 ± 1,11	78,32 ± 1,84	94,78 ± 2,25
NLS PEG - AÇ 0,01%	68,91 ± 1,09	93,41 ± 1,92	98,14 ± 1,74
NLS PEG - CA 1%	33,71 ± 1,21	52,43 ± 1,40	88,85 ± 1,36
NLS PEG - CA 0,1%	51,78 ± 1,25	68,16 ± 1,33	90,86 ± 0,64
NLS PEG - CA 0,01%	57,45 ± 0,58	88,55 ± 1,43	99,11 ± 0,96*

4.10 Foto inativação Bacteriana

A foto inativação microbiana mostrou que as formulações apresentaram pouca capacidade de inibição do crescimento para o microrganismo estudado (figura 41), uma vez que fungos como a *Candida albicans*, apresentam uma maior resistência a fotoinativação, por apresentar uma membrana nuclear que representa uma barreira adicional na incorporação do FS (PERUSSI, 2007).

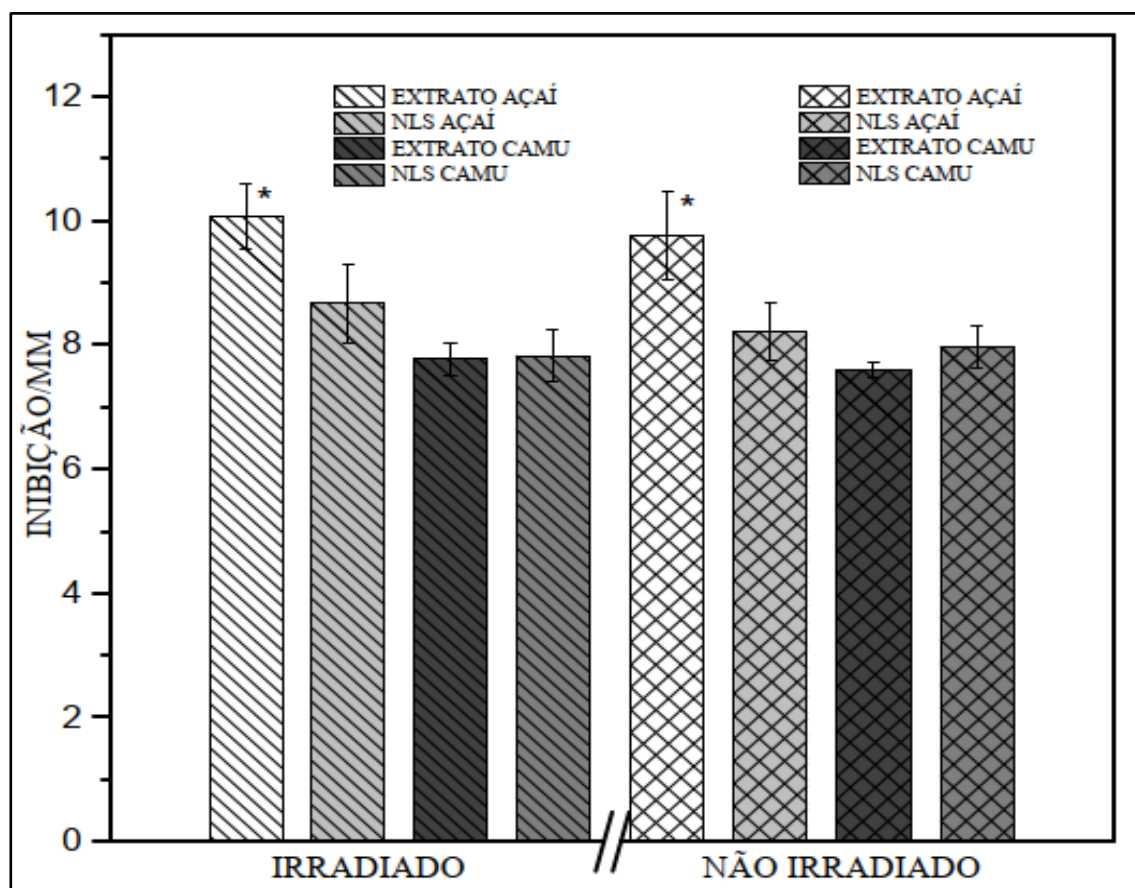


Figura 41. Médias do halo de inibição de *Candida albicans* mediada pelos extratos e formulações sob irradiação de led azul. O * indica uma diferença significativa da inibição em relação extrato e as NLS com 5% de significância pelo teste de Tukey.

5 CONCLUSÃO

Os resultados mostram que as formulações obtidas pela técnica de alta energia de cisalhamento e ultrassom apresentaram um diâmetro hidrodinâmico médio de 116,2 nm para a NLS-BR, NLS-AÇ 119,8 nm e NLS-CA 113,7 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,172, 0,184, e 0,194, o potencial Zeta de -30,05, -35,2 e -32 mV respectivamente, evidenciando que as formulações são estáveis termodinamicamente para o intervalo de tempo avaliado, monodispersas considerando valores de PDI menores que 0,2.

As formulações que foram pegladas tiveram significativa influência no tamanho médio final das NLS, as formulações que foram tratadas com a adição de PEG (+) apresentaram um tamanho médio de 111,91 nm, já as formulações que não tiveram PEG (-) acrescentadas na fase aquosa apresentaram um tamanho médio de 130,45 nm. O PDI das formulações não apresentou diferença significativa em relação à adição do polímero, apresentando valores semelhantes de 0,2, que mostra que a adição de PEG na síntese de NLS a partir manteiga de Cupuaçu, influencia no tamanho médio das nanopartículas, mas não interfere na homogeneidade das formulações.

As imagens de MEV confirmam a morfologia esférica das NLS obtidas com tamanhos inferiores a 200 nm.

As formulações apresentaram eventos térmicos endotérmicos de decomposição de massa em torno de 300 °C.

As formulações não apresentaram citotoxicidade nas células de fibroblastos testadas em 72 h, contudo uma diferença não significativa no aumento da citotoxicidade foi observada para as formulações que foram pegladas.

Na avaliação da fluorescência molecular foi observado que as formulações NLS-BR, NLS-AÇ e NLS-CA apresentaram um pico máximo em 687,5 nm quando excitado em 460 nm.

No teste de decomposição do DPBF ficou evidente a captura de oxigênio *singlete* pelo rebaixamento da absorbância em 416 nm, as medidas de EROS mostraram que tanto os extratos, quanto as formulações são capazes de gerar espécies reativas de oxigênio (ROS) quando irradiadas por luz azul em 470 nm, e não apresentam tal capacidade quando irradiadas por luz vermelha 624 nm, no entanto, a velocidade de decomposição de DPBF é diminuída quando os extratos estão incorporados nas NLS sendo uma característica mediada por carreadores no *drug delivery*.

Na avaliação das formulações para fotoinativação microbiana cada *Candida albicans*, não foi significativa a inibição do micro-organismo. Verificou-se que a aplicação de NLS pode ser viável para a aplicação na entrega de compostos hidrossolúveis e lipossolúveis passíveis de ativação pela luz.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGGARWAL, B. B.; SUNG, B. Pharmacological basis for the role of curcumin in chronic diseases: An age-old spice with modern targets. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.30, n.2, p. 85–94, 2009.
- ALBARICI, T. R.; PESSOA, J. D. C. Effects of heat treatment and storage temperature on the use of açaí drink by nutraceutical and beverage industries. **Food Science and Technology**, v. 32, p. 9-14, 2012.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E.R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, C.; SOUZA-SOARES, L.A. Revisão: características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- BAAS, P.; MANSOM, I.; TINTEREN, H.; STEWART, F. A.; ZANDWIJK, N. Effect of N-acetylcysteine on photofrin-induced skin photosensitivity in patients. **Lasers in surgery and medicine**, v. 16, n. 4, p. 359-367, 1995.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M.L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents. **Trends in Biotechnology**, v. 26, n. 11, p. 612-621, 2008.
- BERNE, B. J.; PECORA, R. **Dynamic Light Scattering: With Applications to Chemistry, Biology, and Physics**. Dover Publications, 2000. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books>. Acesso em 15/04/2021.
- BORGES, L. L.; CONCEIÇÃO, E. C.; SILVEIRA, D. Active compounds and medicinal properties of *Myrciaria* genus. **Food Chemistry**, v. 153, p. 224-233, 2014.
- BYVALTSEV, V. A. et al. Acridine Orange: A Review of Novel Applications for Surgical Cancer Imaging and Therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. 925, 2019.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one-photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 1, n. 4, p. 279-93, 2004.

- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodyn Ther**, v. 2, n. 1, p. 1-23, 2005.
- CEDRIM, P. C. A. S.; BARROS, E. M. A.; NASCIMENTO, T. G. D. Propriedades antioxidantes do açaí (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, 2018.
- CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DO AMAZONAS - CETEFAM. Cartilhas temáticas. **Cupuaçu**. Ministério da Educação. Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica do Amazonas. 29 p. 2007.
- CHAGAS, E. G. L. D. **Produção, caracterização e aplicação de farinhas obtidas a partir do resíduo agroindustrial do processamento do camu-camu**. 2019. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga.
- CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, D.; MISHRA, B.; SINGH, S. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 73, n. 1, p. 1-15, 2009.
- CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. **Chem Rec**, v. 17, n. 8, p. 775-802, 2017.
- COHEN, K. D. O.; JACKIX, M. D. N. H. Características Químicas e Física da Gordura de Cupuaçu e da Manteiga de Cacau. **Embrapa Cerrados-Documentos**, v. 269, p. 22, 2009.
- COHEN, K. O.; LUCCAS, V.; SOUSA, M. V.; JACKIX, M. N. H. Processamento tecnológico das amêndoas de cacau e de cupuaçu. Belém, PA: **Embrapa Amazônia Oriental (Documetnos)**, n.36 p. 178, 2003.
- CORAL, R. P. S. *O cupuaçu: boa opção para investimento*. Belém: Sagri, 1992. p.88

- DAMYEH, M. S.; R. MEREDDY, M. E. NETZEL AND Y. SULTANBAWA. "An insight into curcumin-based photosensitization as a promising and green food preservation technology." **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, n. 19 v.4, 2020.
- FURTADO, C.M.; FARIA, F.S. E. D.V.; AZEVEDO, R. B.; PY-DANIEL, K.; SANTOS, C.A.L.; SILVA, J. R.; HOLANDA, O.E.; RODRIGUEZ, A. F. R.; DEGTEREV, I. A. Tectona grandis leaf extract, free and associated with nanoemulsions, as a possible photosensitizer of mouse melanoma B16 cell. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 167, p. 242-248, 2017.
- DE MOURA ROCHA, S. M. B. Benefícios funcionais do açaí na prevenção de doenças cardiovasculares. **Journal of Amazon Health Science (Revista de Ciências da Saúde na Amazônia)**, v. 1, n. 1, p. 1-10, 2015.
- DE OLIVEIRA, M. D. S.; DE CARVALHO, J. E. U.; DO NASCIMENTO, W. M. O. **Açaí (Euterpe oleracea Mart.)**. Funep Jaboticabal, Brazil, 2000.
- DEROSA, M. C.; CRUTCHLEY, R. J. Photosensitized singlet oxygen and its applications. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 233-234, p. 351-371, 2002.
- DEUS, R. J. A. D. et al. Efeito fungitóxico in vitro do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga Hayne*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, p. 347-353, 2009.
- DI STASI, L.; LIMA, C.A. H. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: Editora Unesp, 2002.
- DO CARMO, M. A. V. et al. Camu-camu (*Myrciaria dubia*) seeds as a novel source of bioactive compounds with promising antimalarial and antischistosomicidal properties. **Food Research International**, v. 136, p. 109334, 2020.
- DOUGHERTY, T. J. An Update on Photodynamic Therapy Applications. **Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery**, v. 20, n. 1, p. 3-7, 2002.

- DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 12, p. 889-905, 1998.
- EBERMANN, R.; ALTH, G.; KREITNER, M.; KUBIN, A. Natural products derived from plants as potential drugs for the photodynamic destruction of tumor cells. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 36, n. 2, p. 95-97, 1996.
- FERREIRA, S. D. et al. Analysis of mitochondria, endoplasmic reticulum and actin filaments after PDT with ALPcS (4). **Lasers and Medical Sciences**, v. 18, n. 4, p. 207-12, 2004
- FORESTO, E.; GILARDI, P.; IBARRA, L. E.; COGNO, I. S. Light-activated green drugs: How we can use them in photodynamic therapy and mass-produce them with biotechnological tools. **Phytomedicine Plus**, v.1 n.3, p.1-16, 2021.
- HAMBLIN, M. R.; HUANG, Y. **Handbook of Photomedicine**. CRC Press, 2013. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=kBDSBQAAQBAJ> >. Acesso em 08/01/2020.
- HOU, D.; XIE, C.; HUANG, K.; ZHU, C. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). **Biomaterials**, v. 24, n. 10, p. 1781-1785, 2003.
- INOUE, T. et al. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of Cardiology**, v. 52, n. 2, p. 127-132, 2008.
- ISMAIL, M. S.; WEITZEL, H.; BERLIEN, H.-P. Applied Photosensitizers Classification for Clinical Photodynamic Therapy. 1998, Berlin, Heidelberg. Springer Berlin Heidelberg. p.300-304.
- JUNIOR, M. J.; VARANDA, L. C. O mundo dos coloides. **Química nova na escola**, v. 9, p. 9-13, 1999.

- KARMAKAR, S. Particle Size Distribution and Zeta Potential Based on Dynamic Light Scattering: Techniques to Characterize Stability and Surface distribution of Charged Colloids. In: (Ed.), 2019. p.117-159.
- KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 3, p. 206-220, 2005.
- KUERSCHNER, L.; EJSING, C.S.; EKROOS, K.; SHEVCHENKO, A.; ANDERSON, K. I.; THIELE, C. Polyene-lipids: A new tool to image lipids. **Nature Methods**, v. 2, n. 1, p. 39-45, 2005.
- KWIATKOWSKI, S. et al. Photodynamic therapy - mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed Pharmacother**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.
- LAKOWICZ, J. R. **Principles of Fluorescence Spectroscopy**. Springer US, 2013. Disponível em: < <https://books.google.com.br/books?id=1bLVBwAAQBAJ> >. Acesso em 18/11/2022.
- LI, T.; YAN, L. Functional Polymer Nanocarriers for Photodynamic Therapy. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 133, 2018.
- LIM, C. K. et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. **Cancer Letters**, v. 334(2), n. 1872-7980 (Electronic), p. 176–187, 2012.
- LIM, S. B.; BANERJEE, A.; ONYUKSEL, H. Improvement of drug safety by the use of lipid-based nanocarriers. **J Control Release**, v. 163, n. 1, p. 34-45, Oct 10 2012.
- LIMA, A.; DAL PIZZOL, C.; FILIPPIN, M. F.; CRECZYNSKI-PASA, T.; ANDRADE, G.; RIBEIRO, A.; PERUSSI, J.R. Hypericin encapsulated in solid lipid nanoparticles: Phototoxicity and photodynamic efficiency. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, v. 125, p. 146-154, 2013.
- LIPSON, R. L.; BALDES, E. J.; OLSEN, A. M. The Use of a Derivative of Hematoporphyrin in Tumor Detection. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 26, n. 1, p. 1-11, 1961. Disponível em: < <https://doi.org/10.1093/jnci/26.1.1> >. Acesso em: 6/14/2020.

- LOCHHEAD, R. Y.; RULISON, C. J. An investigation of the mechanism by which hydrophobically modified hydrophilic polymers act as primary emulsifiers for oil-in-water emulsions 1. Poly (acrylic acids) and hydroxyethyl celluloses. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 88, n. 1, p. 27-32, 1994.
- MALVERN, L. I. **Measuring Surface Zeta Potential using the Surface Zeta Potential Cell**. Application Note. Worcestershire, UK: 7 p. 2014.
- MARQUES, E. F. Da ciência à nanotecnologia. **Revista de Ciência Elementar**, v. 2, n. 3, p. 5, 2014.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles Production, characterization and applications, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p.165-196, 2001.
- MILANE, L. et al. multi-functional nanocarriers for targeted delivery of drugs and genes. **Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society**, v. 130, p. 121-8, 05/01 2008.
- MISHRA, D. K.; SHANDILYA, R.; MISHRA, P. K. Lipid based nanocarriers: a translational perspective. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 14, n.7, p. 2023-2050, 2018.
- MOAN, J.; CHRISTENSEN, T.; SOMMER, S. The main photosensitizing components of hematoporphyrin derivative. **Cancer Letters**, v. 15, n. 2, p. 161-166, 1982.
- MONGE-FUENTES, V.; MUEHLMANN, L. A; LONGO, J. P. F.; SILVA, J. R.; FASCINELI, M.L.; SOUZA, P.; FARIA, F.; DEGTEREV, I. A.; RODRIGUEZ, A.F.R.; CARNEIRO, F.P.; LUCCI, C.M.; ESCOBAR, P.; AMORIM, R. F. B.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion:

A potential treatment for melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v.166, p. 301-310, 2017.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NYMAN, E. S.; HYNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 73, n. 1-2, p. 1-28, 2004.

O'CONNOR, A.; GALLAGHER, W.; T BYRNE, A. Porphyrin and Nonporphyrin Photosensitizers in Oncology: Preclinical and Clinical Advances in Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, p. 1053-74, 2009.

OLIVEIRA, K. T. D. et al. Basic Concepts and Applications of Porphyrins, Chlorins and Phthalocyanines as Photosensitizers in Photonic Therapies. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, 2015. ISSN 1984-6835.

OLIVEIRA, L. Benefícios comprovados de óleos Brasileiros. **Cosmetics & Toiletries**, v. 15, 2003.

ORTEL, B.; SHEA, C. R.; CALZAVARA-PINTON, P. Molecular mechanisms of photodynamic therapy. **Front Biosci (Landmark Ed)**, v. 14, p. 4157-72, Jan 1 2009.

EKAMBARAM, P.; ABDUL HASAN SATHALI, A.; PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. **Scientific Reviews and Chemical Communications**, v. 2, n.1, p. 80-102, 2012.

PHOTOBIOLOGY, E. S. et al. **Photodynamic Therapy**. Royal Society of Chemistry, 2007. ISBN 9781847551658. Disponível em: <
<https://books.google.com.br/books?id=bG0oDwAAQBAJ>>. Acesso em 27/08/2023.

- PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera sp.*): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, p. 465-472, 2009.
- PRAMUAL, S.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SVASTI, J.; BERGKVIST, M.; JOUAN-HUREAUX, V.; ARNOUX, P.; FROCHOT, C.; BARBERI-HEYOB, M.; NIAMSIRI, N. Polymer-lipid-PEG hybrid nanoparticles as photosensitizer carrier for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 12-22, 2017.
- QIDWAI, A. A.; NABI, B.; KOTTA, S.; NARANG, J.K.; BABOOTA, S.; ALI, J. Role of nanocarriers in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 30, p. 1-8, 2020.
- ROCHA, F. S.; GOMES, A. J.; LUNARDI, C. N. Graphene oxide–metallophthalocyanine hybrids with enhanced singlet oxygen generation. **Materials Research Bulletin**, v. 114, p. 45-51, 2019.
- RODRIGUES, M.; MUEHLMANN, L.; LONGO, J.; SILVA, R.; GRAEBNER, I.; DEGTEREV, I.; LUCCI, C.; AZEVEDO, R.; GARCIA, M. Photodynamic Therapy Based on *Arrabidaea chica* (Crajiu) Extract Nanoemulsion: In vitro Activity against Monolayers and Spheroids of Human Mammary Adenocarcinoma MCF-7 Cells. **Journal of Nanomedicine and Nanotechnology**, v.6, n.3, p. 1-6, 2015.
- SMIDERLE, O. J.; DE SOUSA, R. D. C. P. Teor de vitamina C e características físicas do camu-camu em dois estádios de maturação. **Revista Agro ambiente On-line**, v. 2, n. 2, p. 61-63, 2010.
- SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial, **Química Nova**, n. 34, v.10, p.1762-1769, 2011.
- SPIKES, J. D. *The historical development of ideas on applications of photosensitized reactions in the health sciences*. In: Primary photo-processes in biology and medicine: Springer, Boston, MA. 1985. p.209-227.

- SPIKES, J. D. New trends in photobiology: Chlorins as photosensitizers in biology and medicine. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 6, n. 3, p. 259-274, 1990.
- STETEFELD, J.; MCKENNA, S.; PATEL, T. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, p. 1-19, 2016.
- SHUKLA, A. K.; BISHNOI, R.; DEV, S. K.; KUMAR, M.; FENIN, V. Biopharmaceutical Classification System: Tool based prediction for drug dosage formulation. **Advanced Pharmaceutical Journal**, v. 2, n.6, p. 204-209, 2017.
- TEIXEIRA, G. L. **ESTUDO DA ESTABILIDADE E COMPORTAMENTO REOLÓGICO DE EMULSÕES DE GORDURA DE CUPUAÇU (*Theobroma grandiflorum*) COM DIFERENTES TENSOATIVOS**. 2014. 89 (Mestre). Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p. 1532-1555, 2006.
- VASCONCELOS, K. R. F. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de *Copaifera multijuga* Hayne. **Revista Brasileira de farmacognosia**, v. 18, p. 733-738, 2008.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química nova**, v. 25, n. 2, p. 273-286, 2002.
- VELASQUE, L. F. L.; LOBO, A. C. M. Revisão de literatura sobre os efeitos terapêuticos do açaí e sua importância na alimentação. **Biosaúde**, v. 18, n. 2, p. 97-106, 2016.
- WEBER, S.; ZIMMER, A.; PARDEIKE, J. Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 86, n. 1, p. 7-22, 2014.

- WEISS, J.; DECKER, E.A.; MCCLEMENTS, D. J.; KRISTBERGSSON, K.; HELGASON, T.; AWAD, T. Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 146-154, 2008.
- WÖHRLE, D. et al. Photodynamic therapy of cancer: second and third generations of photosensitizers. **Russian Chemical Bulletin**, v. 47, n. 5, p. 807-816, 1998.
- YANG, H. et al. New Bioactive Polyphenols from Theobroma grandiflorum “Cupuaçu”. **Journal of natural products**, v. 66, n. 11, p. 1501-1504, 2003.
- YANG, Y.; CORONA III, A.; SCHUBERT, B.; REEDER, R.; HENSON, M.A. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 418, p. 261-72, 2014.
- YANKOVSKY, I. **Evaluation of photodynamic activity of chlorine-type photosensitizers with β -cyclodextrins nanovectors**. Université de Lorraine Belarussian State University, 2016.
- YOON, I.; LI, J. Z.; SHIM, Y. K. Advance in photosensitizers and light delivery for photodynamic therapy. **Clin Endosc**, v. 46, n. 1, p. 7-23, Jan 2013.
- ZANETTI-RAMOS, B. G. Quebrando paradigmas com a Nanotecnologia. **Cosmetics & Toiletries**, v. 27, 2015.
- ZARBIN, A. J. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469, 2007.
- ZHANG, M. et al. Pyropheophorbide 2-Deoxyglucosamide: A New Photosensitizer Targeting Glucose Transporters. **Bioconjugate Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 709-714, 2003.
- KUMAR, R.; SINGH, A.; GARG, N. Acoustic Cavitation-Assisted Formulation of Solid Lipid Nanoparticles using Different Stabilizers, **ACS Omega**, n.4, v.8, 2019.
- AHMED, S.; GULL, A.; ALAM, M.; AQIL, M.; SULTANA, Y.; Ultrasonically tailored, chemically engineered and “QbD” enabled fabrication of agomelatine nanoemulsion;

optimization, characterization, ex-vivo permeation and stability study, **Ultrasonics Sonochemistry**, v 41, p. 213-226, 2018.

DANIELL, M. D.; HILL, S.J. A history of photodynamic therapy. **Australian and New Zealand Journal of Surgery**, v.61, n.5, p.340-348, 1991.

MARQUES, M.R.C.; CHOO, Q.; ASHTIKAR, M.; ROCHA, T.C.; BREMER-HOFFMANN, S.; WACKER, M.G. Nanomedicines - Tiny particles and big challenges. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.151-152, p.23-43, 2019.

SELLERAF, P.; GARGANOR, G.; POGLIANIF, C. Terapia fotodinâmica: revisão de literatura. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 12, n. 1, p. 5-13, 24 out. 2014

WYSS, P.; TADIR, Y.; TROMBERG, B.J.; HALLER, U. (eds): Photomedicine in Gynecology and Reproduction. **Basel, Karger**, p. 4–11, 2000.

WEISS, A.; DEN BERGH, H.V.; GRIFFIOEN, W.A.; NOWAK-SLIWINSKA, P. Angiogenesis inhibition for the improvement of photodynamic therapy: The revival of a promising idea, **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer**, v. 1826, n. 1, p. 53-70, 2012.

BETHEA, D.; FULLMER, B.; SYED, S.; SELTZER, G.; TIANO, J.; RISCHKO, C.; GILLESPIE, L.; BROWN, D.; GASPARRO, F. P. Psoralen photobiology and photochemotherapy: 50 years of science and medicine. **Journal of dermatological science**, 19(2), 78–88, 1999.

AMOR, B.T; JORI, G. Sunlight-activated insecticides: historical background and mechanisms of phototoxic activity, **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.30, n.10, p. 915-925, 2000.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Química Nova**, v. 23, p. 237-243, 2000.

- SZEIMIES, R.M.; DRÄGER, J.; ABELS, C.; LANDTHALER, M. Chapter 1 History of photodynamic therapy in dermatology, Editor(s): Piergiacomo Calzavara-Pinton, Rolf-Markus Szeimies, Bernhard Ortel, **Comprehensive Series in Photosciences**, Elsevier, Volume 2, Pages 3-15, 2001.
- KESSEL, D.; DOUGHERTY, T.J. An Appreciation. **Photochem Photobiol**, n. 96, p. 454-457, 2020.
- KENNEDY, J. C.; POTTIER, R. H.; PROSS, D.C.; Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principles and present clinical experience. **J Photochem Photobiol B**. n.6, v.1-2, p.143-148, 1990.
- CORREIA, J. H., RODRIGUES, J.A.; PIMENTA, S.; DONG, T.; YANG, Z. "Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions" **Pharmaceutics** **13**, n. 9, p. 1332, 2021.
- OGILBY, P. Chem Inform Abstract: Singlet Oxygen: There Is Indeed Something New under the Sun. **Chemical Society reviews**. n. 39, p. 3181-209, 2010.
- Baptista, M. S., et al. (2017). "Type I and Type II Photosensitized Oxidation Reactions: Guidelines and Mechanistic Pathways." **Photochem Photobiol** **93**(4): 912-919.
- YAN, H.; CHEN, Y.; ZHANG, J.; LIU, W.; CHEN, R. The Role of Free Radicals in the Photodynamic Treatment of Fibrotic Skin Diseases. **Adv Exp Med Biol**. n. 923, p. 69-74, 2016.
- ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M.R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochemical Journal**, v. 473, n.4, p.347-364, 2016.
- MESQUITA, M. Q., et al. "An insight on the role of photosensitizer nanocarriers for Photodynamic Therapy." **Anais da Academia Brasileira de Ciências** n.90. 2018.
- HAMBLIN, M. R. Photodynamic Therapy for Cancer: What's Past is prologue." **Photochem Photobiol** **96**(3): 506-516, 2020.

- KATO, H. "History of photodynamic therapy--past, present and future." **Gan To Kagaku Ryoho** 23(1): 8-15, 1996.
- GOMER, C. J. Preclinical examination of first and second generation photosensitizers used in photodynamic therapy. **Photochemical Photobiology**, v. 54, n.6, p.1093-107, 1991.
- RIESZ, C.P.; KRISHNA, M. "Phthalocyanines and Their Sulfonated Derivatives as Photosensitizers in Photodynamic Therapy.," Proceedings Volume 0847, **New Directions in Photodynamic Therapy**, 1988.
- MFOUO-TYNGA, I. S.; DIAS, L.D.; INADA, N.M.; KURACHI, C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. **Photodiagnosis Photodynamic Therapy** v. 34, n.102091, 2021
- BRAGA, F.C. Brazilian traditional medicine: Historical basis, features and potentialities for pharmaceutical development, **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v.8, n.1, P.44-50, 2021.
- SENAPATHY, G.J.; GEORGE, B.P.; ABRAHAMSE, H. Exploring the Role of Phytochemicals as Potent Natural Photosensitizers in Photodynamic Therapy. **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, v.20, n.15, p.1831-1844, 2020.
- ELISABETSKY, E.; SHANLEY, P.; Ethnopharmacology in the Brazilian Amazon. **Pharmacology & Therapeutics**, v.64, n.2, 1994, p. 201-214, 1994.
- DA SILVA, F.C.; ARRUDA, A.; LEDEL, A.; DAUTH, C.; ROMÃO, A.F.; VIANA, R.N.; FERRAZ, A. B.F.; PICADA, J.N.; PEREIRA, P. Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu–camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells, **Food and Chemical Toxicology**, v.50, n. 7p. 2275-2281, 2012.
- MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JR.; V.F.; GRYNBERG, N.F. ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova** [Internet]. n. 25, 2002.

- SILVA, R. F. D., et al. "Qualidade nutricional e padrão microbiológico da polpa de açaí comercializada nas feiras livres dos Municípios do Estado do Acre, Brasil / Nutritional quality and microbiological standard of açaí pulp marketed at open markets in the Municipalities of the State of Acre, Brazil." **Brazilian Journal of Development**, v. 8, n.5, p. 40195-40212, 2022.
- NEVES, L. T. B. C., et al. "Qualidade de frutos processados artesanalmente de açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) e bacaba (*Oenocarpus bacaba* Mart.)." *Revista Brasileira de Fruticultura* 37: 729-738, 2015.
- LEPORATTI, S. Thinking about Enhanced Permeability and Retention Effect (EPR). **Journal of Personalized Medicine**, v.12, n.8, p.1259, 2022.
- ANANIKOV, V. P. Organic-Inorganic Hybrid Nanomaterials. **Nanomaterials**. v.9, n. 9, p.1197, 2019.
- ZALESSKAYAA, G.A., ULASHCHIK, V.S. Molecular mechanisms of photochemotherapy (Review). **Journal of Applied Spectroscopy**, v.76, p. 44–65, 2009.
- BRUM, A.A.S.; ARRUDA, L.F.; REGITANO-D´ARCE, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. **Química Nova**, 2009 v.32, n.4, 2009.
- FAHY, E.; COTTER, D.; SUD, M.; SUBRAMANIAM, S. Lipid classification, structures and tools. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v.1811, n.11, p. 637-647, 2011.
- UNER, M.; YENER, G. Importance of solid lipid nanoparticles (SLN) in various administration routes and future perspectives. **International Journal of Nanomedicine**, v.2, n.3, p.:289-300, 2007.
- DE MENEZES GOMES, Isabella Vivian et al. Desenvolvimento de sabonete em barra com manteiga de cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*). **Research, Society and Development**, v. 11, n. 8, p. e46811831146-e46811831146, 2022.
- MEDEIROS, Magda Leite; LANNES, Suzana Caetano da Silva. Propriedades físicas de substitutos do cacau. **Food Science and Technology**, v. 30, p. 243-253, 2010.

- GANESAN, P.; NARAYANASAMY, D. Lipid nanoparticles: Different preparation techniques, characterization, hurdles, and strategies for the production of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for oral drug delivery. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 6, p. 37-56, 2017.
- TADROS, T.; IZQUIERDO, P.; ESQUENA, J.; SOLANS, C. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science** v.108-109, p.303-318, 2004.
- MARCATO, P. D. Preparação, caracterização e aplicações em fármacos e cosméticos de nanopartículas lipídicas sólidas. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, n.2, 2009.
- FADDA, P.; MONDUZZI, M.; CABOI, F.; PIRAS, S.; LAZZARI, P. Solid lipid nanoparticle preparation by a warm microemulsion based process: influence of microemulsion microstructure. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 446, n.1-2, p.166-175, 2013.
- FREITAS, D.S; SPENCER, P.J; VASSÃO, R.C; ABRAHÃO-NETO, J. Biochemical and biopharmaceutical properties of PEGylated uricase, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 387, n. 1–2, 2010
- GUTIÉRREZ, J. M.; GONZÁLEZ, C.; MAESTRO, A.; SOLÈ, I.; PEY, C. M.; NOLLA, J. Nano-emulsions: New applications and optimization of their preparation. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v.13, n.4, p.245-251, 2008.
- GUO, T.; YONGTAI, Z.; ZHAO, J.; ZHU, C.; FENG, N. Nanostructured lipid carriers for percutaneous administration of alkaloids isolated from *Aconitum sinomontanum*. **Journal of Nanobiotechnology**, v.13, n. 47, p.1-14, 2015.
- YAMADA, M.; TAYEB, H.; WANG, H.; DANG, N.; MOHAMMED, Y. H.; OSSEIRAN, S.; BELT, P. J.; ROBERTS, M. S.; EVANS, C. L.; SAINSBURY, F.; PROW, T. W. Using elongated microparticles to enhance tailorable nanoemulsion delivery in excised human skin and volunteers. **Journal of Control Release**, n.288, p. 264-276, 2018.
- FENG, L.; MUMPER, R. J. A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery. **Cancer Letters**, v.334, n. 2, p. 157-175, 2013.

- PARHI, R.; SURESH, P.; Production of solid lipid nanoparticles-drug loading and release mechanism. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 2, n. 1, p. 211-27, 2010.
- YOU, J.; WAN, F.; DE CUI, F.; SUN, Y.; DU, Y.Z.; HU, F.Q. Preparation and characteristic of vinorelbine bitartrate-loaded solid lipid nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 343, n.1, p. 270-276, 2007.
- DINGLER, A.; GOHLA, S; Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. **Journal of Microencapsulation**, v.19, n.1, p. 11-16, 2002.
- SONNEVILLE-AUBRUN, O.; SIMONNET, J. T.; L'ALLORET, F. Nanoemulsions: a new vehicle for skincare products. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 145-149, 2004.
- TRIPLETT, M. D.; RATHMAN, J. F. Optimization of β -carotene loaded solid lipid nanoparticles preparation using a high shear homogenization technique. **Journal of nanoparticle research**, v. 11, p. 601-614, 2009.
- PUGLIA, C.; OFFERTA, A.; RIZZA, L.; ZINGALE, G.; BONINA, F.; RONSISVALLE, S. Optimization of curcumin loaded lipid nanoparticles formulated using high shear homogenization (HSH) and ultrasonication (US) methods. **Journal of nanoscience and nanotechnology**, v. 13, n. 10, p. 6888-6893, 2013.
- PATIL, M. N.; PANDIT. A. B. Cavitation – A novel technique for making stable nano-suspensions. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 5, p. 519-530, 2007.
- MITRI, K.; VAUTHIER, C.; HUANG, N.; MENAS, A.; RINGARD-LEFEBVRE, C.; ANSELMIS, C.; STAMBOULI, M.; ROSILIO, V.; VACHON, J.J.; BOUCHEMAL, K. Scale-up of Nanoemulsion Produced by Emulsification and Solvent Diffusion. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 11, p. 4240-4247, 2012.

- IMBROGNO, A.; DRAGOSAVAC, M. M.; PIACENTINI, E.; VLADISAVLJEVIĆ, G. T.; HOLDICH, R. G.; GIORNO, L. Polycaprolactone multicore-matrix particle for the simultaneous encapsulation of hydrophilic and hydrophobic compounds produced by membrane emulsification and solvent diffusion processes. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 135, p. 116-125, 2015.
- MOREIRA, M. J.; SANTOS, O. D. H. S.; DELICATO, T.; GONÇALVES, A. R.; ROCHA-FILHO, P. A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison, **Advances in Colloid and Interface Science**, v.163, n. 2, p. 90-122, 2011.
- TROTTA, M.; DEBERNARDI, F.; CAPUTO, O. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification–diffusion technique. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 257 n.1, p. 153-160, 2003.
- LOCHHEAD, Y, R. Chapter 3 - Basic Physical Sciences for the Formulation of Cosmetic Products. Editor(s): Kazutami Sakamoto, Robert Y. Lochhead, Howard I. Maibach, Yuji Yamashita, **Cosmetic Science and Technology**, Elsevier, 2017, Pages 39-76.
- CLOGSTON, J.D.; PATRI, A.K. Zeta Potential Measurement. In: McNeil, S. (eds) Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery. **Methods in Molecular Biology**, v. 697, 2011.
- HUANG, J.; MO, X.; FU, H.; SUN, Y.; GAO, Q.; CHEN, X.; ZOU, J.; YUAN, Y.; NIE, J.; ZHANG, Y.; Tyndall-effect-enhanced supersensitive naked-eye determination of mercury (II) ions with silver nanoparticles, **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 344, p. 130218, 2021.
- BHATTACHARJEE, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 337-351, 2016.
- TEGOS, G. P.; HAMBLIN, M.R. Disruptive innovations: new anti-infectives in the age of resistance. **Current Opinion in Pharmacology**, v.13, n.5, p. 673-677, 2013.

- DIGMAN, Michelle A.; GRATTON, Enrico. Lessons in fluctuation correlation spectroscopy. **Annual review of physical chemistry**, v. 62, p. 645-668, 2011.
- MAXWELL, K.; JOHNSON, G. N. Chlorophyll fluorescence—a practical guide, **Journal of Experimental Botany**, v. 51, n. 345, p. 659–668, 2000.
- ZHENG, Y.; LI, Z.; CHEN, H.; GAO, Y. Nanoparticle-based drug delivery systems for controllable photodynamic cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 1, p. 144:105213, 2020.
- STETEFELD, J.; MCKENNA, S.; PATEL, T. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. Biophysical Reviews, v. 8, p. 1-19, 10/01 2016.
- ZHOU, X.; HAO, Y.; YUAN, L.; PRADHAN, S.; SHRESTHA, K.; PRADHAN, O.; LIU, H.; LI, W. Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review. **Chinese Chemical Letters**, v.29, n.12, p. 1713-1724, 2018.
- IBIAPINA, A.; GUALBERTO, L. D. S.; DIAS, B. B.; FREITAS, B. C. B.; MARTINS, G. A. D. S.; MELO FILHO, A. A. Essential and fixed oils from Amazonian fruits: properties and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 62, n.32, p.8842-8854, 2021.
- MANEA, A.M.; ANDRONESCU, C.; MEGHEA, A. Green Tea Extract Loaded Into Solid Lipid Nanoparticles. **UPB Scientific Bulletin**, v. 76, n. 2, 2014.
- WISSING, S. A.; KAYSER, O.; MULLER, R. H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 56, n. 9, p. 1257-1272, 2004.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 163, n. 2, p. 90-122, 2001.
- LIM, C. K.; HEO, J.; SHIN, S.; JEONG, K.; SEOH.Y.; JANG,W.D.; PARK, S.Y.; KIM, S.; KWON, I.K. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p.176–187, 2012.
- MANSOORI, B.; MOHAMMADI, A.; DOUSTVANDI, M.; F MOHAMMADNEJAD, F.; KAMARI, F.; GJERSTORFF, M.; BARADARAN, B.; HAMBLIN, M. Photodynamic therapy for cancer: Role of natural products. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 26, p.395-404, 2019.
- GOVINDARAJAN, V.S. Turmeric – chemistry, technology and quality. **CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 12, n.3, p. 199-301, 1980.

- MILÁN, D.R. Cúrcuma, produção e utilização como ingrediente e aditivo na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Corantes Naturais**, v. 1, n. 1, p. 248-249, 1992.
- MARTINS, C.V. B.; SILVA, D. L.; NERES, A.T. M.; MAGALHÃES, T. F. F.; WATANABE, G. A.; MODOLO, L. V. Curcumin as a promising antifungal of clinical interest. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, n.2, p. 337-339, 2009.
- FERREIRA, E. M. M.; SOTTORIVA, H. M.; MELO, D. R.; ROCHA, M. S.; PEREIRA, N. S.; RIBEIRO, M. M.; ALVES, G. Propriedades e usos da cúrcuma. Arquivos de Ciência Veterinária e Zoologia. UNIPAR , Umuarama, **Anais do III Concivet**, v. 22, n. 3, p. 89-90, 2019.
- PRUTHI, J.S. **Spices and condiments: chemistry, microbiology, technology**. New York: Academic Press, 1980. 434 p.
- TEMBA, B. A.; FLETCHER, M. T.; FOX, G. P.; HARVEY, J. J. W.; SULTANBAWA, Y. Inactivation of *Aspergillus flavus* spores by curcumin-mediated photosensitization. **Food Control**, n.59, 708-713, 2016.
- GOEL, A.; KUNNUMAKKARA, A.B.; AGGARWAL, B.B. Curcumin as “Curecumin”: from kitchen to clinic. *Biochemical. Pharmacology*, v. 75, p.787–809, 2008.
- FALCO, W. F., A. M. QUEIROZ, J. FERNANDES, E. R. BOTERO, E. A. FALCÃO, F. E. G. GUIMARÃES, J. C. M'PEKO, S. L. OLIVEIRA, I. COLBECK AND A. R. L. Caires. "Interaction between chlorophyll and silver nanoparticles: A close analysis of chlorophyll fluorescence quenching." **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry** v. 299, p. 203-209, 2014.
- LIKHANOV, A. "Identification of Intervarietal Affinity of Rubus Idaeus L. Plants on Biochemical Profiles of Phenolic Compounds." **Reports of NULES of Ukraine № 7 (49): 12**, 2014.
- JOURNAL OF ANTIMICROBIAL CHEMOTHERAPY. v. 71, p. 3026–3035, 2016.
- FLECK, C. A.; M. NEWMAN. "Advanced Skin Care—A Novel Ingredient." **Journal of the American College of Clinical Wound Specialists**, v. 4(4), p. 92-94, 2012.
- PERUSSI, J.R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova** [Internet]. v. 30 (4), p. 988–94, 2007
- MAISCH T, BOSL C, SZEIMIES RM, LEHN N, ABELS C. Photodynamic effects of novel XF porphyrin derivatives on prokaryotic and eukaryotic cells. **Antimicrob Agents Chemother**. v. 49(4), p. 1542-1552, 2005.
- RAMOS, A. L. **Síntese e caracterização de Nanopartículas Lipídicas Sólidas a partir da manteiga de cupuaçu - Theobroma Grandiflorum (Shum) com aplicações**

nanobiotecnológicas. 2017. 63 p. Dissertação de mestrado - Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, ACRE, 2017.

NEGI, J. S. et al. Development of solid lipid nanoparticles (SLNs) of lopinavir using hot self nano-emulsification (SNE) technique. **European Journal Pharmaceutics Science**, v. 48, n. 1-2, p. 231-9, 2013.

PRAMUAL, S.; LIRDPRAPAMONGKOL, K.; SVASTI, J.; BERGKVIST, M.; JOUAN-HUREAUX, V.; ARNOUX, P.; NIAMSIRI, N.; Polymer-lipid-PEG hybrid nanoparticles as photosensitizer carrier for photodynamic therapy. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 173, p. 12-22, 2017.

STETEFELD, J.; MCKENNA, S.; PATEL, T. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, p. 1-19, 2016.

ANEXOS



Avaliação da fotoatividade de nanopartículas lipídicas no carregamento de extrato de plantas amazônicas

Evaluation of the photoactivity of lipid nanoparticles in the carrying of extract from amazonian plants

DOI: 10.55905/ndelov.16.n43-020

Recebimento dos originais: 18/04/2023
Aceitação para publicação: 19/05/2023

Anderson Luis Ramos

Doutorando em Biotecnologia e Biodiversidade
Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC)
Endereço: Rio Branco - AC, Brasil
E-mail: anderson.amos@gmail.com

Jaine Rodrigues da Rocha

Mestre em Ciências da Saúde na Amazônia Ocidental
Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC)
Endereço: Rio Branco - AC, Brasil
E-mail: jainerodriguesbq@gmail.com

Fernando Sérgio Escócio Drummond Viana de Faria

Pós-Doutor em Nanobiotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC)
Endereço: Rio Branco - AC, Brasil
E-mail: fernandoescocio@gmail.com

Anselmo Fortunato Ruiz Rodriguez

Pós-Doutor em Nanociências e Nanobiotecnologia
Instituição: Universidade Federal do Acre (UFAC)
Endereço: Rio Branco - AC, Brasil
E-mail: anselmo.rodriguez@ufac.com

RESUMO

Neste trabalho preparamos nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) a base da manteiga de Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) para o carregamento do extrato aquoso da polpa de açaí (*Euterpe oleracea*) e camu-camu (*Myrciaria florinda*). As NLS foram obtidas pela técnica de cisalhamento e ultrassom e caracterizadas pela técnica de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), termogravimetria (TG-DSC) e microscopia de eletrônica de Varredura (MEV). As propriedades espectroscópicas das formulações e dos extratos foram avaliadas por UV-Vis e espectroscopia molecular de fluorescência. A fotoatividade foi verificada pela decomposição do 1, 3-difenil-isobenzofurano (DPBF) e diodo emissor de luz - LED azul. As NLS apresentaram um raio hidrodinâmico médio de 116,2, 119,8 e 113,7 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,172, 0,184, e 0,194, o potencial Zeta de -30,05, -35,2 e -32 mV respectivamente. As imagens de MEV



confirmam a morfologia esférica das NLS obtidas. As formulações apresentaram eventos térmicos com absorção do calor (endotérmicos) de decomposição de massa em torno de 300 °C. As formulações não apresentaram citotoxicidade nas células de fibroblastos testadas em 72 h. Na avaliação da fluorescência molecular foi observado que as formulações NLS-BR, NLS-AÇ e NLS-CA apresentaram um pico máximo em 687,5 nm quando excitado em 460 nm. No teste de decomposição do DPBF ficou evidente a captura de oxigênio *singlete* pelo rebaixamento da absorbância em 416 nm. Na avaliação das formulações para fotoinativação microbiana para *Candida albicans*, não foi significativa a inibição do micro-organismo. Verificou-se que a aplicação de NLS pode ser viável para a aplicação na entrega de compostos hidrossolúveis passíveis de ativação pela luz.

Palavras-chave: Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS), extrato de plantas, fotoatividade.

ABSTRACT

In this work we prepared solid lipidic nanoparticles (SLN) based on Cupuaçu butter (*Theobroma grandiflorum*) to carry aqueous extract of açai (*Euterpe oleracea*) and camu-camu (*Myrciaria florinda*) pulp. The NLS were obtained by shear and ultrasonic technique and characterized by Dynamic Light Scattering (DLS), thermogravimetry TG-DSC and scanning electron microscopy SEM. The spectroscopic properties of the formulations and extracts were evaluated by UV-Vis and spectrofluorescence. The photoactivity was verified by 1, 3-diphenyl-isobenzofuran (DPBF) decomposition and light emitting diode - blue LED. The obtained NLS showed an average hydrodynamic diameter of 116.2, 119.8 and 113.7 nm, polydispersity index (PDI) of 0.172, 0.184, and 0.194, the Zeta potential of -30.05, -35.2 and -32 mV respectively. SEM images confirm the spherical shape of obtained NLS. The formulations showed endothermic thermal events of mass decomposition around 300 °C. The formulations showed no cytotoxicity on fibroblast cells tested at 72 h. In the molecular fluorescence evaluation it was observed that NLS-BR, NLS-AÇ and NLS-CA formulations showed a maximum peak at 687.5 nm when excited at 460 nm. In the DPBF decomposition test it was evident the capture of singlet oxygen by the decrease of the absorbance at 416 nm. In the evaluation of the formulations for microbial photoinactivation for *Candida albicans*, the inhibition of the microorganism was not significant. It was found that the application of NLS may be feasible for the delivery of light-activatable water-soluble compounds.

Keyword: Solid Lipidic Nanoparticles (SLN), plant extracts, photoactivity

1 INTRODUÇÃO

No contexto científico atual, a nanotecnologia emerge como uma estratégia inovadora para diversos campos da pesquisa sejam médico, diagnóstico, terapêutico, farmacêuticos, cosméticos ou ainda na indústria têxtil, energética, entre outros (ZANETTI-RAMOS, 2015). As multifaces desta nova ciência se dão pela sua gênese nas áreas fundamentais da ciência e tecnologia como a química dos materiais, física, biologia, medicina e engenharias (MARQUES, 2014). As Nanoplataformas são ferramentas oriundas da ciência na escala submicrométrica e são



comumente usadas para a entrega de fármacos e drogas de diferentes classes, estes sistemas são conhecidos como DDS (*drug delivery systems*) (ZHENG et al., 2020).

Estes nanossistemas podem, alterar/potencializar algumas características físico-químicas das moléculas como área de contato, solubilidade interação com a luz, condutibilidade, redução de toxicidade etc (ZARBIN, 2007). Dentre as nanoplateformas que podem ser utilizadas na entrega de fármacos, destacam-se os nanocarreadores de base orgânica como os lipossomas, micelas, nanopartículas poliméricas biodegradáveis, nanoemulsões e nanopartículas lipídicas sólidas – NLS (TORCHILIN, 2006).

Inicialmente, as NLS foram desenvolvidas em 1991, como um sistema alternativo de encapsulamento e entrega de fármacos e princípios bioativos em relação aos tradicionais sistemas coloidais, tais como emulsões, lipossomas e nanopartículas poliméricas (MÜLLER et al., 2000; SOUTO et al., 2011). NLS são carreadores coloidais em escala submicrométrica, seu tamanho pode variar de 50 a 1000 nm, com núcleo lipídico sólido em temperatura ambiente e são biocompatíveis, podendo ser de origem animal ou vegetal (ceras, esteróides, ácidos graxos, mono, di e tri glicerídeos) dispersos em água com diversos tipos de emulsificantes e surfactantes (EKAMBARAM, 2012).

NLS's tem como característica o tamanho reduzido e a ampla área de superfície, boa capacidade de encapsulamento do fármaco, principalmente fármacos pouco solúveis em água, como os da classe II e IV, de acordo com o Sistema de Classificação de Biofarmacêuticos (BCS), (SHUKLA et al., 2017).

Estas moléculas podem ser incorporadas de forma homogênea na matriz, na cápsula de cobertura ou ainda no núcleo (*core*) lipídico (MEHNERT e MÄDER, 2012). Estes nanossistemas podem entregar a substância ativa numa concentração adequada durante o período de tratamento, dirigindo-a para o local desejado de ação, já que os tratamentos convencionais nem sempre atendem a esses requisitos (BONIFACIO et al., 2014).

Segundo YANG e colaboradores (2014) a entrega controlada do conteúdo presente nas NLS torna este carreador vantajoso em comparação a outros sistemas de entrega coloidais; tendo em vista que, no seu núcleo sólido em temperatura ambiente, ocorre menor mobilidade no conteúdo incorporado, possibilitando um maior controle na velocidade de liberação controlada das substâncias presentes na matriz lipídica, melhorando a estabilidade física de compostos lábeis.



Por apresentar biocompatibilidade, os lipídeos se tornaram muito populares no desenvolvimento de carreadores para medicamentos e mais recentemente em cosméticos (CHAKRABORTY et al., 2009). No quadro 1, podemos observar as principais razões do uso de sistemas de base lipídica e as características mais relevantes dos carreadores desenvolvidos a partir de lipídeos.

Quadro 1. Indicações de uso para sistemas e carreadores de base lipídica. Adaptado de ZHOU et al. (2018).

Justificativa para uso de sistemas de base lipídica	Características dos carreadores de base lipídica
• Adaptabilidade de excipientes • Versatilidade no desenvolvimento da formulação • Perfil de baixo risco • Maior biodisponibilidade oral com menor variação do perfil plasmático • Alta penetração na entrega tópica • Inovação de produtos com apelo de mercado • Escalabilidade	• Entrega controlada e direcionada de medicamentos • Estabilidade do fármaco • Incremento e melhora do conteúdo farmacológico em comparação a outros sistemas de transporte • Capacidade de incorporação de fármacos hidrofílicos e lipofílicos • Biocompatível e biodegradável • Dose uniforme e melhorada • Redução da dose terapêutica devido a melhor absorção • Perfil de baixo risco

Quando se toma como base a biodiversidade da Amazônia brasileira, várias são as possibilidades para a prospecção de novos bioativos presentes em espécies vegetais que podem ter aplicabilidade baseada em informações do conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais e Produtos Florestais Não Madeireiros - PFNM locais (GAMA, 2016). Dentre esses produtos encontrados na floresta podemos destacar a manteiga de cupuaçu - *Theobroma grandiflorum*, aparece como fonte lipídica para aplicação, pesquisas e estudos de base tecnológica (CETEFAM, 2007).

As sementes possuem um rico e balanceado teor de triglicerídeos e ácidos graxos como esteárico, oléico, araquídico que trazem efeitos altamente benéficos sobre a pele (COHEN e JACKIX, 2009). A manteiga de cupuaçu é rica em compostos antioxidantes entre eles a teograndina I e II em complemento a outros flavonoides já conhecidos (YANG et al., 2003). Por estas qualidades, COLOMÉ e colaboradores (2010) utilizaram manteiga de cupuaçu como base lipídica na preparação de (Teosferas) para aplicações tópicas, e vêm mostrando bons resultados na composição de formulações para o carreamento de resveratrol (SOLDATI et al., 2018).



A biodiversidade local favorece a prospecção, obtenção e desenvolvimento de novos bioprodutos e tecnologias, assim o cupuaçu mostra-se com atrativos promissores no desenvolvimento de nanocarreadores lipídicos com aplicações nanobiotecnológicas, ajudando a agregar valor aos produtos naturais de origem vegetal que fazem parte da nossa floresta.

O objetivo deste trabalho foi sintetizar e caracterizar nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) para uso como nanocarreadores, a partir da manteiga de cupuaçu *Teobroma grandiflorum*, como componente lipídico principal para carrear extratos de plantas amazônicas que apresentam cromóforos como o açaí (*Euterpe oleracea*) e camu-camu (*Myrciaria florinda*) com possíveis propriedades fotossensibilizantes - FS.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Na preparação das NLS foi utilizada manteiga de cupuaçu como componente lipídico majoritário nas formulações de síntese das nanopartículas. A manteiga foi adquirida juntamente à Associação de Produtores Rurais Vencedora (ASPRUVE) localizada no município de Nova Califórnia, Rondônia, Brasil (9°45'24.23" S e 66°36'27.40" O).

Os tensoativos usados nas formulações foram 80 TWEEN (Sigma Aldrich UK) e 80 SPAN (Sigma Aldrich USA), água ultrapura obtida no Aqua Master ALL® (Gehaka), todos os reagentes foram utilizados assim como recebidos. Foi utilizada a técnica de homogeneização a quente (MEHNERT, 2012) para a preparação das pré-emulsões. Cada amostra foi preparada em tubo de ensaio de vidro de 20 mL. A fase lipídica contendo o surfactante foi aquecida em banho maria a 55±5 °C, e homogeneizada com o auxílio de um homogeneizador tipo rotor-estator (Turax®-T 18).

As amostras foram misturadas à fase aquosa por um período de 10 min em 7.000 rpm (MANEA et al., 2014), em seguida a ultrassonificação (Bandelin UW 2070) por um período igual de 10 min, a 70% da amplitude para reduzir partículas em escala nanométrica. A formulação foi resfriada à temperatura ambiente sob agitação constante (RAMOS, 2017).

2.1 CARACTERIZAÇÃO DA NANOEMULSÕES

2.1.1 Espalhamento dinâmico de luz

A média do diâmetro e o índice de polidispersividade (PDI) das dispersões de NLS foram determinadas por DLS usando um Zetasizer Nano ZS 90 (Malvern Instruments; Malvern, UK).



Para facilitar a medição, cada amostra foi diluída na proporção 1:100 com água bidestilada para cada medição, as leituras foram realizadas em triplicata a uma temperatura de 25 °C.

2.2.2 Potencial zeta

O potencial Zeta (ζ) das partículas lipídicas foi realizado usando o Zeta Size Nano ZS 90 (Malvern Instruments, Malvern, UK). As amostras foram diluídas na proporção 1:100 com água bidestilada e acondicionada em cubeta poliestireno modelo (DTS 1070).

2.2.3 Medidas espectroscópicas

A verificação das propriedades fotofísicas das formulações foi verificada através *screening* fluorimétrico com excitação variando 410 a 500 nm, passo de 10 nm para cada varredura, a missão foi fixada em 610 a 770 nm com abertura do caminho óptico (*s/nr*) em 2,5 para a emissão, em um espectrofluorímetro Perkin Elmer (LS 55 UK). As medidas de absorbância foram realizadas em um espectrofotômetro Shimadzu (UV-1601 Japan), em cubetas de quartzo com caminho óptico de 1 cm.

2.2.4 Microscopia eletrônica de varredura - MEV

As imagens da morfologia e o tamanho das NLS foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura (TESCAN, modelo VEGA 3).

2.2.5 Medidas termogravimétricas - TG/DSC

As análises térmicas foram realizadas em um calorímetro Netzsch modelo Jupiter STA449 – F3 em uma atmosfera de nitrogênio com fluxo de 20 mL.min⁻¹, e taxa de aquecimento de 10 °C.min⁻¹ até a temperatura final de 600 °C. A massa da amostra analisada foi de 20 mg, em cadinhos de óxido de alumina.

2.2.6 Teste de viabilidade celular

O teste de citotoxicidade foi realizado conforme a metodologia de AHMED e colaboradores (1994) para analisar o efeito tóxico das formulações em células da linhagem MRC-5 após exposição por 72 h. Em placas de 96 poços, as células de MRC-5 foram plaqueadas na



concentração de $0,5 \times 10^4$ células por poço. Após 24 h de incubação e aderência das células, as mesmas foram tratadas com NLS nas concentrações de 1%, 0,1% e 0,01%.

Passados os tempos de tratamento, adicionou-se 10 µL da solução de uso de Alamar Blue (solução estoque 0,4% 1:20 em meio de cultura) na respectiva triplicata de tratamento. Para controle negativo foi utilizado apenas o meio de cultura com DMSO a 0,01%. Após o tempo de metabolização da resazurina (3 h), realizou-se a leitura da fluorescência em leitor DTX 880 Multimode Detector (Beckman Coulter Inc. Fullerton, CA, USA). A viabilidade foi calculada conforme a fórmula: % viabilidade = (Abs da amostra/média da Abs do controle negativo) x 100.

2.2.7 Teste de fotoinativação microbiana

Cepa padrão testada foi de *Candida albicans* (ATCC 10231) que foram suspensas em solução salina estéril (0,9%) na escala 0,5 de McFarland e estriada em meio de cultura ágar Sabouraud dextrose com swab estéril. Passados 10 min de repouso para que a suspensão aderisse ao meio, discos de papel de filtro de 5 mm estéreis foram embebidos 10 µL das formulações e foram dispostos sobre o meio.

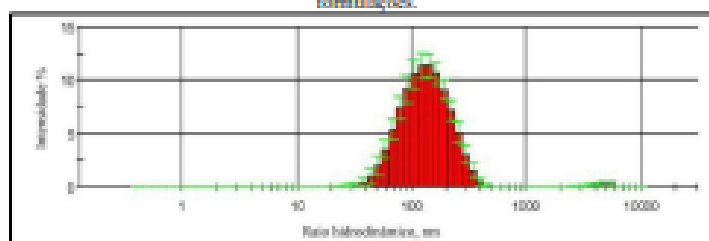
A placa controle não irradiada foi protegida por papel alumínio e reservada. A placa teste foi irradiada com led azul de 50 W por um período de 10 minutos, ambas foram incubadas à 37 °C por 24 h. Após a incubação, a fotoinativação dos extratos e das formulações foram analisadas a partir da dimensão dos halos de inibição, medidos com o auxílio de uma régua.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As formulações obtidas por meio da técnica de cisalhamento e ultrassom apresentaram um tamanho médio de 116,62 nm, com um índice de polidispersividade médio de 0,183 e um potencial Zeta médio de -32,5 mV para as três formulações. Figura 1.



Figura 1. Histograma das NLS-BR, NLS-AÇ, NLS-CA com tamanho médio de 116,78 nm para as três formulações.



O tamanho médio das NLS obtidas mostra a eficiência da técnica mista de cisalhamento e ultrassom na produção de nanopartículas lipídicas sólidas em escala submicrométrica (SAHU et al., 2014). Os valores obtidos mostram as médias do raio hidrodinâmico, o índice de polidispersividade e de potencial Zeta. Quadro 1. O asterisco indica diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey com 95% de significância.

Tabela 1. Tamanho médio, índice de polidispersividade e potencial Zeta para as NLS obtidas.

Formulações	Raio hidrodinâmico $\bar{X}$ (nm)	PDI $\bar{X}$	Potencial Zeta (mV) $\bar{X}$
NLS - BR	116,2	0,172	-30,5
NLS - AÇ	119,8*	0,184	-35,2
NLS - CA	113,7*	0,194*	-32

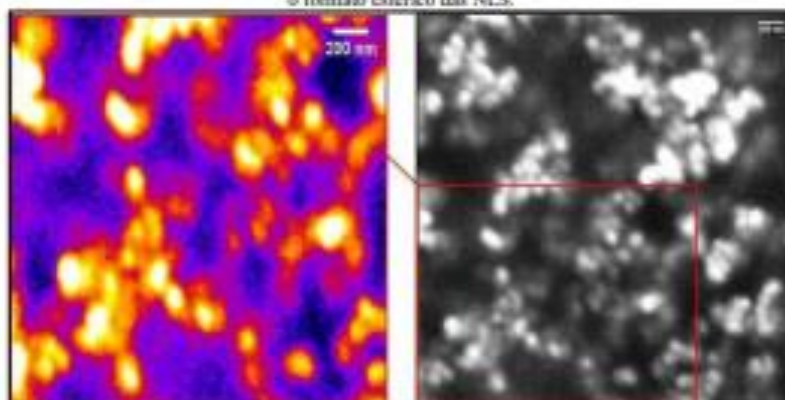
O índice de polidispersividade PDI médio 0,183 mostra que as formulações não apresentam agregados e há homogeneidade nas amostras, valores de PDI próximos de 1 caracterizam uma amostra com maior heterogeneidade, por outro lado, valores mais próximos de 0 indicam a uniformidade da formulação (STETEFELD et al., 2016).

O potencial Zeta médio das formulações estudadas foi de -32,5 mV, indicando estabilidade coloidal do sistema gerado pelas forças de repulsão elétricas presente na superfície das NLS, valor que quanto mais distante de 0 (zero), maior a tendência do sistema coloidal estar em estabilidade (BHATTACHARJEE, 2016).

Através das imagens de microscopia de varredura pode-se corroborar a predominância do formato esférico das NLS que compõem as formulações, e tamanho médio inferior a 200 nm. Figura 1.

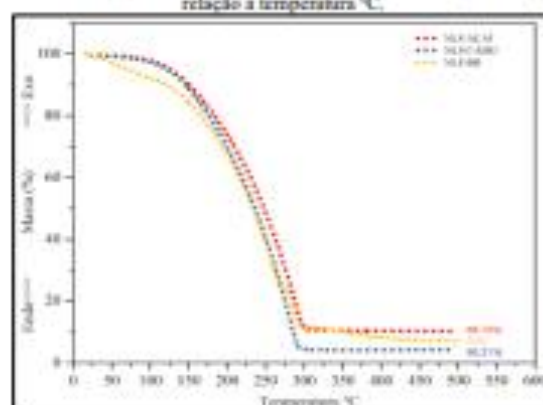


Figura 2. Foto microscopia eletrônica de varredura - MEV da formulação NLS-BR, heat map do recorte evidencia o formato esférico das NLS.



Nas análises termogravimétricas verificou-se um comportamento térmico semelhante para as três formulações, com estabilidade à decomposição até a temperatura inicial média de 100 °C, com a perda máxima de massa alcançada na faixa dos 300 °C. Na figura 2, vemos que as curvas do TG apresentam a quantidade de massa (%) que foi perdida durante o aquecimento. A formulação NLS-AÇAÍ perdeu 88,79%, NLS-BR 92% e NLS-CAMU 95,21% respectivamente.

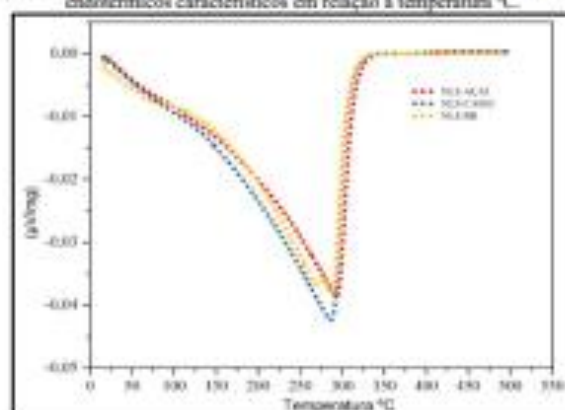
Figura 2. Termograma das NLS-AÇAÍ, NLS-BR e NLS-CAMU, com suas respectivas perdas de massa (%) em relação à temperatura °C.





Os eventos térmicos que caracterizam a perda de massa das amostras são predominantemente de natureza endotérmica, representados na figura 3. De maneira semelhante em todas as amostras, na faixa de temperatura de 300 °C que concentram os eventos térmicos.

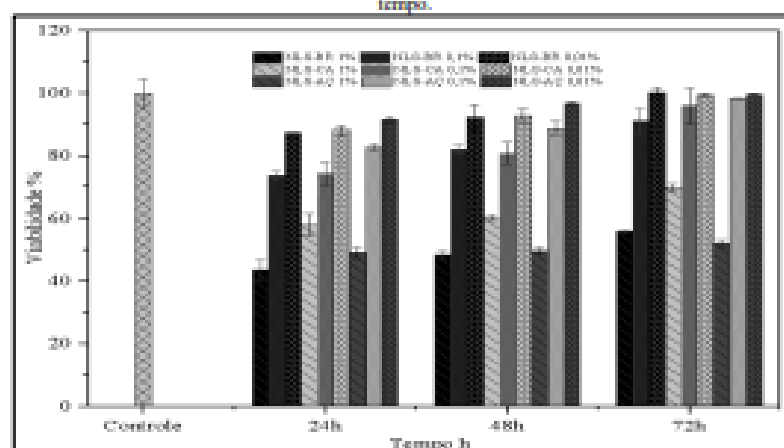
Figura 3. Termograma (DSC) das NLS-AÇAÍ, NLS-BR e NLS-CAMU com seus respectivos eventos endotérmicos característicos em relação à temperatura °C.



Na figura 4 pode-se observar a viabilidade das células *in vitro* em função do tempo, é possível verificar que nas primeiras 24 h de incubação houve uma diminuição média significativa da viabilidade para as três formulações NLS-BR, NLS- AÇ, NLS-CA nas 1%, 0,1% e 0,01% quando comparado a 100% do meio controle.



Figura 4 Gráfico de médias da viabilidade celular em 72 h. Mostra o aumento da viabilidade celular em função do tempo.



Na avaliação da viabilidade celular média em 48 h, nota-se uma melhora significativa no número de células viáveis nas concentrações de 0,01% para as três formulações. No tempo de 72 h, a viabilidade se mantém para as concentrações de 0,01%, de todas as formulações e ainda a concentração de 0,1% para NLS-AÇ.

Tabela 2. Valores médios e desvio padrão da viabilidade das formulações em 24, 48 e 72 h. Valores seguidos de * não diferem em relação ao controle com significância de 5% pelo teste de Tukey.

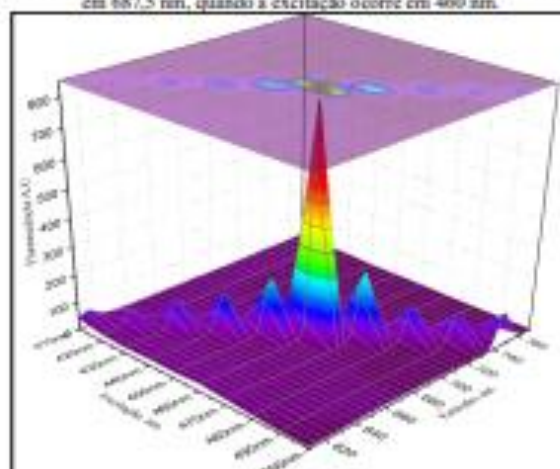
VIABILIDADE DAS FORMULAÇÕES %	24 h	48 h	72 h
	MÉDIA E DESVIO PADRÃO		
NLS - BR 1%	43,69 ± 3,68	73,61 ± 1,03	87,29 ± 0,14
NLS - BR 0,1%	48,35 ± 1,06	82,18 ± 1,38	92,24 ± 3,95
NLS - BR 0,01%	55,78 ± 0,58	91,03 ± 4,1*	100,40 ± 1,37*
NLS - AÇ 1%	48,97 ± 1,68	82,85 ± 0,75	96,61 ± 0,90
NLS - AÇ 0,1%	49,42 ± 1,12	88,78 ± 2,01	96,05 ± 0,36*
NLS - AÇ 0,01%	51,96 ± 1,04	98,19 ± 0,13*	99,05 ± 0,23*

NLS - CA 1%	57,93 ± 3,68	74,34 ± 3,52	88,18 ± 1,49
NLS - CA 0,1%	60,31 ± 0,84	80,84 ± 3,56	92,62 ± 2,20
NLS - CA 0,01%	69,87 ± 1,02	96,01 ± 5,63*	99,35 ± 0,7*

A baixa viabilidade das formulações pode ser atribuída aos componentes tensoativos das formulações, que podem apresentar alguma toxicidade às células em relação a outros tipos de tensoativos, mesmo com o tensoativo estando presente em baixas concentrações (MÜLLER et al., 1997). A viabilidade tende a melhorar conforme o período de incubação aumenta (ARECHABALA et al., 1999), um aumento significativo é observado nas formulações que contém o extrato de camu camu e açaí, plantas com reconhecidas propriedades anti-oxidantes (INOUE et al., 2008; CEDRIM et al., 2018).

Na avaliação da fluorescência molecular das NLS foi verificado um pico de emissão máxima da fluorescência em 687,5 nm quando a formulação é excitada no comprimento de onda de 460 nm na Figura 5.

Figura 5. Gráfico do *scanning* de fluorescência molecular da formulação NLS-BR com pico máximo de emissão em 687,5 nm, quando a excitação ocorre em 460 nm.

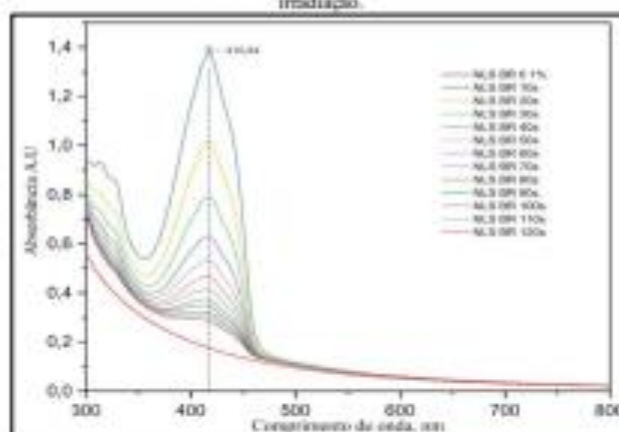


A capacidade de geração das espécies reativas de oxigênio - ROS foi avaliada pelo método químico indireto mediante a fotodecomposição do 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF)



como sonda química usada para a captura do $^1\text{O}_2$ (SPILLER et al., 1998). O rebaixamento da intensidade da absorbância do DPBF em 416 nm em relação ao tempo de irradiação, com LED azul. Figura 6, mostra a capacidade da foto oxidação das formulações (ROSSI et al., 2008).

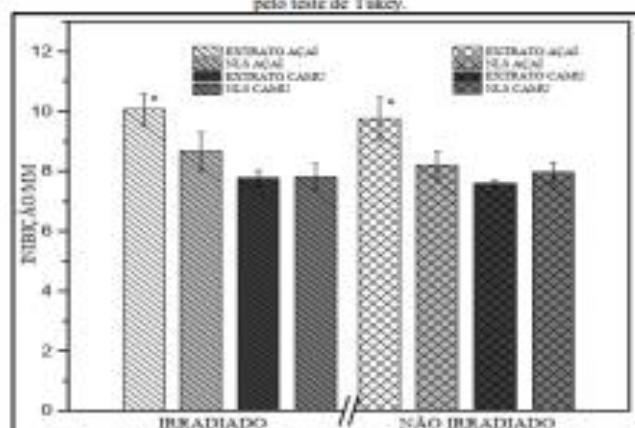
Figura 6. Espectro de absorbância do DPBF na presença da formulação NLS-BR, sob diferentes tempos de irradiação.



A foto inativação microbiana mostrou que as formulações apresentaram pouca capacidade de inibição do crescimento para o microrganismo estudado, uma vez que fungos como a *Candida albicans*, apresentam uma maior resistência a fotoativação, por apresentar uma membrana nuclear que representa uma barreira adicional na incorporação do FS (PERUSSI, 2007).



Figura 7. Médias do halo de inibição de *Candida albicans* mediada pelos extratos e formulações sob irradiação de luz azul. O * indica uma diferença significativa da inibição em relação extrato e as NLS com 5% de significância pelo teste de Tukey.



4 CONCLUSÃO

As NLS obtidas pela técnica de alta energia de cisalhamento e ultrassom apresentaram um diâmetro hidrodinâmico médio de NLS-BR 116,2, NLS-AÇ 119,8 e NLS-CA 113,7 nm, índice de polidispersão (PDI) de 0,172, 0,184, e 0,194, o potencial Zeta de -30,05, -35,2 e -32 mV respectivamente. As imagens de MEV confirmam a morfologia esférica das NLS obtidas. As formulações apresentaram eventos térmicos endotérmicos de decomposição de massa em torno de 300 °C. As formulações não apresentaram citotoxicidade nas células de fibroblastos testadas em 72 h. Na avaliação da fluorescência molecular foi observado que as formulações NLS-BR, NLS-AÇ e NLS-CA apresentaram um pico máximo em 687,5 nm quando excitado em 460 nm. No teste de decomposição do DPBF ficou evidente a captura de oxigênio *singlete* pelo rebaixamento da absorbância em 416 nm. Na avaliação das formulações para fotoinativação microbiana cada *Candida albicans*, não foi significativa a inibição do micro-organismo. Verificou-se que a aplicação de NLS pode ser viável para a aplicação na entrega de compostos hidrossolúveis passíveis de ativação pela luz.



REFERÊNCIAS

- AHMED, S.A.; GOGAL JR.R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H]thymidine incorporation assay. *Journal of Immunological Methods*, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.
- BENTES-GAMA, M.M. Principais relações de comercialização de produtos florestais não madeireiros (PFNM) na Amazônia. *Agronline.com.br*. Disponível em: <http://www.agronline.com.br/artigos/principais-relacoes-comercializacao-produtos-florestais-nao-madeireiros-pfnm-amazonia>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2022.
- BONIFÁCIO, B.V.; SILVA, P.B; RAMOS, M.A; NEGRI, K.M; BAUAB, T.M; CHORILLI, M. *Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review*. *International Journal of Nanomedicine*.v.9 p.1-13, 2014.
- CHAKRABORTY, S.; SHUKLA, D.; MISHRA, B.; SINGH, S. Lipid – An emerging platform for oral delivery of drugs with poor bioavailability. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 73, n. 1, p. 1-15, 2009.
- CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA do AMAZONAS - CETEFAM. Cartilhas temáticas. Cupuaçu. Ministério da Educação. *Secretaria de Educação Profissional e Tecnológica do Amazonas*. 29 p. 2007.
- EKAMBARAM, P.; SATHALI, A.H.; PRIYANKA, K.P. Solid Lipid Nanoparticles: A Review. *Scientific Reviews Chemical Communications*, v. 2(1), p. 80-102, 2012.
- COHEN, K. D. O.; JACKIX, M. D. N. H. Características Químicas e Física da Gordura de Cupuaçu e da Manteiga de Cacau. *Embrapa Cerrados-Documents*, v. 269, p. 22, 2009.
- COLOMÉ, L.M.; RAFFIN, R.P.; ASSUMPTÇÃO, E.R.; POHLMANN, A.R.; GUTERRES, S.S.; Theospheres Based on *Theobroma Grandiflorum* Seed Butter: Development of Innovative Nanoparticles for Skin Application." *Soft Materials* 8(2): 72-88. 2010.
- SAHU, A.K.; KUMAR, T.; JAIN, V. Formulation optimization of erythromycin solid lipid nanocarrier using response surface methodology. *Biomed Research International*, 8 p. 2014.
- STETEFELD, J.; MCKENNA, S.; PATEL, T. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. *Biophysical Reviews*, v. 8, p. 1-19, 2016.
- SOURAV BHATTACHARJEE. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release*, v 235, p. 337-351, 2016.
- MANEA, A.M.; ANDRONESCU, C.; MEGHEA, A. Green Tea Extract Loaded Into Solid Lipid Nanoparticles. *UPB Scientific Bulletin*, v. 76, n. 2, 2014.
- MARQUES, E. F. Da ciência à nanotecnologia. *Revista de Ciência Elementar*, v. 2, n. 3, p. 5, 2014.



MÜLLER, R. H.; MÄDER, K.; GOHLA, S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – a review of the state of the art. **European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics**, v.50, n.1, p.161-177, 2000.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, p. 83-101, 2012.

MÜLLER, R. H.; RÜHL, D.; RUNGE, S.; SCHULZE-FORSTER, K.; MEHNERT, W. Cytotoxicity of Solid Lipid Nanoparticles as a Function of the Lipid Matrix and the Surfactant. **Pharmaceutical Research** v.14, n.4 p 458–462 1997.

ARECHABALA, B.; COIFFARD, C.; RIVALLAND, P.; COIFFARD, L.J.; DE ROECK-HOLTZHAUER, Y. Comparison of cytotoxicity of various surfactants tested on normal human fibroblast cultures using the neutral red test, MTT assay and LDH release. **Journal of Applied Toxicology**, v. 19, n. 3, p.163-165, 1999.

CEDRIM, P. C. A. S. B.; BARROS, E. M. A.; NASCIMENTO, T. G. Propriedades antioxidantes do açaí (*Euterpe oleracea*) na síndrome metabólica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.21, p.1-7, 2018.

INOUE, T.; KOMODA, H.; UCHIDA, T.; NODE, K. Tropical fruit camu-camu (*Myrciaria dubia*) has anti-oxidative and anti-inflammatory properties. **Journal of Cardiology**, v. 52, n. 2, 127-132, 2008.

SOLDATI, P. P.; POLONINI, H. C.; PAES, C. Q.; RESTREPOB, J. A. S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CHAVES, M. G. A. M.; BRANDÃO, M. A. F.; PITTELLA, F.; RAPOSO, N. R. B. Controlled release of resveratrol from lipid nanoparticles improves antioxidant effect, **IFAC-PapersOnLine**, v. 51, n. 27, p. 16-21, 2018.

SPILLER, W.; KLIESCH, H.; WÖHRLE, D.; HACKBARTH, S.; RÖDER, B.; SCHNURPFEIL, G. Singlet oxygen quantum yields of different photosensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v.2, p. 145-158, 2012

RAMOS, A. L. Síntese e caracterização de Nanopartículas Lipídicas Sólidas a partir da manteiga de cupuaçu - *Theobroma Grandiflorum* (Shum) com aplicações nanobiotecnológicas. 2017. 63 p. Dissertação de mestrado - Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia, Universidade Federal do Acre, Rio Branco, ACRE, 2017.

ROSSI, L. M.; SILVA, P. R.; VONO, L. L. R.; FERNANDES, A. U.; TADA, D. B.; BAPTISTA, M. S. Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. **Langmuir : the ACS Journal of Surfaces and Colloids**, n.24. p.12534-12538, 2008.

SOUTO, E. B.; SEVERINO, P.; SANTANA, M. H. A.; PINHO, S.C. Nanopartículas de lipídios sólidos: métodos clássicos de produção laboratorial, **Química Nova**, n. 34, v.10, p.1762-1769, 2011.



REVISTA
DELOS
DESARROLLO
LOCAL SOSTENIBLE

BHATTACHARJEE, SOURAV. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? **Journal of Controlled Release**, v. 235, p.337-351, 2016,

STETEFELD, J.; MCKENNA, S.; PATEL, T. Dynamic light scattering: a practical guide and applications in biomedical sciences. **Biophysical Reviews**, v. 8, p. 1-19, 2016.

TORCHILIN, V. P. Multifunctional nanocarriers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 58, n. 14, p. 1532-1555, 2006.

PERUSSI, J. R. Inativação fotodinâmica de microrganismos. **Química Nova**, v.30, n.4, p. 988–994, 2007.

YANG, Y.; CORONA, A.; SCHUBERT, B.; REEDER, R.; HENSON, M. A. The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 418, p. 261-72, 2014.

YANG, H.; PROTIVA, P.; CUI, B.; MA, C.; BAGGETT, S.; HEQUET, V.; MORI, S.; WEINSTEIN, I.; KENNELLY, E. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* "Cupuaçu". **Journal of natural products**, v. 66, n. 11, p. 1501-1504, 2003.

ZANETTI-RAMOS, B. G. Quebrando paradigmas com a Nanotecnologia. **Cosmetics & Toiletries**, v. 27, 2015.

ZHENG, Y.; LI, Z.; CHEN, H.; GAO, Y. Nanoparticle-based drug delivery systems for controllable photodynamic cancer therapy. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 144, p. 1-17, 2020.

ZARBIN, A. J. Química de (nano) materiais. **Química Nova**, v. 30, n. 6, p. 1469, 2007.

ZHOU, X.; HAO, Y.; YUAN, L.; PRADHAN, S.; SHRESTHA, K.; PRADHAN, O.; LIU, H.; LI, W. Nano-formulations for transdermal drug delivery: A review. **Chinese Chemical Letters**, v.29, n.12, p. 1713-1724, 2018.

SHUKLA, A. K.; BISHNOI, R.; DEV, S. K.; KUMAR, M.; FENIN, V. Biopharmaceutical Classification System: Tool based prediction for drug dosage formulation. **Advanced Pharmaceutical Journal**, v. 2, n.6, p. 204-209, 2017.