



**Universidade de Brasília**

**Instituto de Ciências Biológicas**

**Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia**

# **Desenvolvimento de plataforma para tratamento de melanoma por via oral utilizando fotossensibilizante de terceira geração associado a solvente verde**

Isadora Florêncio de Souza

**Brasília, DF**

**2024**

Isadora Florêncio de Souza

# **Desenvolvimento de plataforma para tratamento de melanoma por via oral utilizando fotossensibilizante de terceira geração associado a solvente verde**

**Orientadora:** Dra. Sônia Nair Bão.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

**Brasília, DF**

**2024**

Este é um trabalho dedicado à minha mãe (*in memoriam*), que sempre foi minha grande inspiração e motivação para esta área de pesquisa. De onde a senhora estiver, mãe, te amo!

## Agradecimentos

Primeiramente eu não poderia deixar de agradecer a Deus, por todo o cuidado que teve comigo até aqui, guiando meus caminhos e iluminando com bênçãos toda a minha jornada.

À minha mãezinha, minha maior inspiração de vida, exemplo de mulher, além de minha saudade diária. A minha admiração pela senhora aumenta de forma exponencial a cada dia, mesmo tendo partido tão cedo me deixou preparada para enfrentar os desafios diários, obrigada por ter me tornado tão forte. Obrigada também por todo o apoio e amor que semeou em mim, sem eles eu certamente não teria chegado até aqui. Espero que esteja orgulhosa de sua filha!

Ao meu amor, Gabriel Dantas. Sou imensamente grata por ter acreditado em mim desde o início (mesmo quando até eu duvidei), por nunca ter soltado minha mão e por ter sido meu acalento durante os dias difíceis ao longo destes dois anos. Você foi a escolha mais certa da minha vida! Todas as minhas conquistas são suas também.

Ao meu pai, que mesmo sem entender direito o que eu tanto fazia na UnB, me desejava sempre “boa aula”, mesmo quando eu nem tinha. Obrigada pelos esforços em me auxiliar no que precisei. Te amo, pai.

À minha sogra, Ângela Dantas, que sempre se orgulhou muito de mim e vibrou comigo em cada conquista. Obrigada pelas orações, por cuidar de mim e por seu colo para chorar, o seu carinho foi essencial para mim. Te amo, Angelina.

À minha orientadora Sônia Bão, obrigada por ter me acolhido em seu grupo e por todo o direcionamento e disponibilidade que teve comigo. À senhora toda a minha admiração.

Ao Victor Mello, que também me orientou, agradeço pelas oportunidades e por sempre ter acreditado em mim e dito para todos que eu era a melhor, isso me motivou buscar a ser.

À Karen Paiva e Marina Mesquita (Jovem), vocês foram um presente que ganhei do mestrado, agradeço por terem estado sempre dispostas a me ajudar em tudo, pelas longas risadas, e pelas doses de tequila. Obrigada por terem tornado toda essa experiência muito mais leve, levarei a amizade de vocês para sempre!

À Luane Salgado, minha pupila científica, com você tenho aprendido mais do que ensinei. Obrigada por estar sempre presente comigo no laboratório e fora dele, por ouvir meus desabafos e pelas sessões de terapia e incentivo. Você é meu orgulho!

À Marina Radicchi e ao Gabriel Ribeiro, minha eterna gratidão por toda a ajuda, seja em bancada ou nos bastidores dela, e pelos ricos momentos de discussões científicas, me inspiro muito em vocês!

A todo o meu grupo de pesquisa, repleto de pessoas incríveis e extraordinárias: Ingrid, Karine, Luísa, Thalita, Leonardo, Ariane e todos os outros, muito obrigada por cada ajuda prestada.

Ao professor João Paulo, por ceder seu laboratório e alunos para que este projeto possa ter se concretizado. Sou muito grata pelo Laboratório de Nanobiotecnologia, que foi minha casa durante o mestrado. Obrigada também Bruno Iles, por me socorrer em meus perrengues e ser minha companhia durante muito tempo no laboratório.

À CAPES e às demais agências de fomento – CNPq, FINEP, FAPDF, e ao Programa de Pós-graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia por possibilitarem o financiamento desta pesquisa.

E por fim, à Universidade de Brasília, que um dia já foi um sonho muito almejado por mim. É um orgulho fazer parte de uma das melhores Universidades do país.

É com o coração transbordando de gratidão que encerro este ciclo acadêmico. Mais uma vez, o meu muito obrigada a todos que fizeram parte da minha jornada para me tornar Mestre.

## RESUMO

O melanoma se configura como uma neoplasia maligna altamente letal e um problema de saúde pública, de modo que os tratamentos existentes são, muitas vezes, ineficazes para conter a progressão da doença. Devido à sua biocompatibilidade, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) surgem como alternativa terapêutica através do nanocarreamento de fotossensibilizantes para o uso na terapia Fotodinâmica (TFD), chamados de fotossensibilizantes de 3ª geração. Porém, a aplicação desta tecnologia ainda enfrenta desafios no que diz respeito à administração por via oral, de modo que a entrega do fotossensibilizante não ocorre de forma adequada na região tumoral. Neste contexto, o presente trabalho tem por objetivo desenvolver uma plataforma para o tratamento de melanoma murino baseada em administração oral de formulação contendo fotossensibilizante de 3ª geração em sua forma concentrada e associado a solvente verde, possibilitando melhor entrega do fármaco no tumor. Para isso, formulações de NLS contendo solvente eutético profundo natural (NaDES) foram desenvolvidas, caracterizadas, submetidas a procedimentos de concentração de partículas e aplicadas em células de melanoma murino. Foram obtidas formulações de NLS de alta estabilidade coloidal, contendo 12,5% de NaDES baseadas em metodologia de baixa energia e com alto valor agregado, resultando no desenvolvimento de um fotossensibilizante de 3ª geração contendo Alumínio-Cloro Ftalocianina (AlPc). O solvente verde utilizado no trabalho permitiu a redução do uso de água nas formulações em 12,5%, além de atuar como crioprotetor para as NLS, possibilitando o seu congelamento para protocolo de concentração das partículas. A metodologia de secagem por liofilização foi a mais adequada para promover concentração das nanopartículas, permitindo o aumento de sua concentração em até três vezes sem o comprometimento de suas aplicações. O fotossensibilizante de 3ª geração desenvolvido no trabalho apresentou alta estabilidade em fluidos gastrointestinais simulados, o que indica o seu alto potencial para se tornar uma plataforma para administração oral. Os ensaios de viabilidade celular demonstraram que o nanocarreador desenvolvido apresentou favorável atividade fotodinâmica antineoplásica em células de melanoma murino, resultando em alta toxicidade celular. Desta forma, esses resultados indicam que o fotossensibilizante de 3ª geração associado a solvente verde desenvolvido no trabalho e submetido a procedimentos de concentração apresenta-se como potencial metodologia para resolver os desafios enfrentados pelas NLS no tratamento do melanoma por via oral.

**Palavras-chave:** Melanoma; Fotossensibilizante de 3ª geração; Nanopartículas Lipídicas Sólidas; Solvente Verde; Terapia Fotodinâmica; Administração Oral.

## ABSTRACT

Melanoma is a highly lethal malignant neoplasm and a public health problem, so existing treatments are often ineffective in halting the progression of the disease. Due to their biocompatibility, solid lipid nanoparticles (SLN) have emerged as a therapeutic alternative through the nanoencapsulation of photosensitizers for use in Photodynamic Therapy (PDT), known as 3rd generation photosensitizers. However, the application of this technology still faces challenges with regard to oral administration, so that the delivery of the photosensitizer does not occur properly in the tumor region. In this context, this study aims to develop a platform for the treatment of murine melanoma based on oral administration containing 3rd generation photosensitizer in its concentrated form and associated with a green solvent, enabling better delivery of the drug to the tumor. For this purpose, SLN formulations containing natural deep eutectic solvent (NaDES) were developed, characterized, subjected to particle concentration procedures and applied to murine melanoma cells. High colloidal stability SLN formulations were obtained, containing 12.5% NaDES based on low energy methodology and with high added value, resulting in the development of a 3rd generation photosensitizer containing Aluminum-Chlorine Phthalocyanine (AlPc). The green solvent used in the work allowed the reduction of water use in the formulations by 12.5%, as well as acting as a cryoprotectant for the SLN, making it possible to freeze them for the particle concentration protocol. The lyophilization methodology was the most suitable to promote concentration of nanoparticles, allowing their concentration to be increased up to three times without compromising their applications. The 3rd generation photosensitizer developed in the work showed high stability in simulated gastrointestinal fluids, which indicates its high potential to become a vehicle for oral administration. Cell viability assays demonstrated that the developed nanocarrier presented favorable antineoplastic photodynamic activity in murine melanoma cells, resulting in high cellular toxicity. Thus, these results indicate that the 3rd generation photosensitizer associated with a green solvent developed in the work and subjected to concentration procedures emerges as a potential methodology to solve the challenges faced by SLN in the treatment of melanoma by oral administration.

**Keywords:** Melanoma; 3rd Generation Photosensitizer; Solid Lipid Nanoparticles; Green Solvent; Photodynamic Therapy; Oral Administration.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer .....	11
Figura 2. Índice de mortalidade em decorrência de câncer no ano de 2022.....	12
Figura 3. Mortalidade causada por melanoma em 2022 .....	13
Figura 4. Esquema representativo do mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica .....	16
Figura 5. Diferentes tipos de nanomateriais .....	18
Figura 6. Representação de nanopartícula lipídica sólida .....	19
Figura 7. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho .....	26
Figura 8. Parâmetros coloidais de formulações de NLS-Branca e NLS-Branca-NaDES com diferentes concentrações do solvente.....	33
Figura 9. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca e NLS-Branca-NaDES com diferentes concentrações do solvente após submetidas a diferentes congelamentos .....	34
Figura 10. Imagem das NLS-Branca-NaDES com diferentes concentrações de solventes após congelamento lento .....	34
Figura 11. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca, NLS-AIPc e NLS-Branca-NaDES 12,5% após secagem por vácuo e centrifugação em Speed Vac.....	36
Figura 12. Imagem da NLS-Branca NaDES (à esquerda) e NLS-Branca (à direita) após 1h de secagem sob vácuo e centrifugação em Speed Vac .....	37
Figura 13. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES 12,5% e NLS-AIPc-NaDES 12,5% antes e depois da secagem por rotaevaporação.....	38
Figura 14. Imagem da NLS-Branca-NaDES (A) e NLS-AIPc-NaDES (B) antes e após a secagem por rotaevaporação.....	38
Figura 15. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES 12,5% e NLS-AIPc-NaDES 12,5% antes e depois da secagem por liofilização.....	40
Figura 16. Imagem da NLS-AIPc-NaDES antes (à esquerda) e após a liofilização (à direita) .....	41

Figura 17. Estabilidade coloidal da NLS-Branca-NaDES durante 365 dias .....	42
Figura 18. Estabilidade coloidal da NLS-AIPc-NaDES durante 365 dias .....	44
Figura 19. Espectro de absorvância de amostras de NLS sem NaDES e NLS com NaDES suspensas em solução aquosa, além da AIPc solubilizada em meio controle (água, etanol e NaDES).....	45
Figura 20. Espectro de fluorescência (excitação em 350 nm) de amostras de NLS sem NaDES e NLS com NaDES suspensas em solução aquosa, além da AIPc solubilizada em meio controle (água, etanol e NaDES).46	
Figura 21. Espectro de absorção do infravermelho por transformada de Fourier para os componentes do NaDES isoladamente (Cloroeto de Colina, Glicerol e Ácido Cítrico) e para o solvente (NaDES) já formulado .....	48
Figura 22. Espectro de absorção do infravermelho por transformada de Fourier para todas as amostras de NLS brancas (sem fármaco), bem como para os componentes que as integram: Murumuru, Brij O10, NaDES, NLS-Branca, NLS-Branca-NaDES, NLS-Branca-NaDES-Liof e NLS-Branca-NaDES-Liof-Res .....	50
Figura 23. Espectro de absorção do infravermelho por transformada de Fourier para todas as amostras de NLS contendo AIPc, bem como para os componentes que as integram: Murumuru, Brij O10, NaDES, AIPc, NLS-AIPc, NLS-AIPc-NaDES, NLS-AIPc-NaDES-Liof e NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res .....	52
Figura 24. Estabilidade coloidal em fluido gastrointestinal simulado ao longo de 6h de digestão .....	53
Figura 25. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão com magnificação de 10.000 vezes da NLS-Branca-NaDES (A) e da NLS-AIPc-NaDES (B), com seus respectivos histogramas de distribuição do tamanho .....	55
Figura 26. Imagem de microscopia eletrônica de transmissão com magnificação de 5.000 vezes da NLS-Branca-NaDES-Liof-Res (A) e da NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res (B) com seus respectivos histogramas de distribuição do tamanho .....	56
Figura 27. Imagem de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes da NLS-Branca-NaDES-Liof-Res (A) e da NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res (B) .....	57
Figura 28. Análise da toxicidade das NLS mediante ensaio de viabilidade celular por MTT de células B16-F10 24h após o tratamento no escuro, sem irradiação (A) e com irradiação por TDF (B) .....	58

## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Vantagens e desvantagens apresentadas pelas diferentes vias de administração voltadas para o tratamento do câncer (via oral, via intravenosa, via subcutânea, via intramuscular e via tópica). .....	21
Tabela 2. Reagentes e produtos utilizados para a realização dos experimentos. ....	25
Tabela 3. Nanopartículas desenvolvidas no projeto e os respectivos componentes nelas presentes. ....	27
Tabela 4. Parâmetros coloidais das NLS sem NaDES e das NLS contendo NaDES antes do processo de liofilização. ....	40
Tabela 5. Parâmetros coloidais das NLS sem NaDES e das NLS contendo NaDES depois do processo de liofilização. ....	41
Tabela 6. Valores de IC <sub>50</sub> para células B16-F10 tratadas após 24h (escuro). ....	59
Tabela 7. Valores de IC <sub>50</sub> para células B16-F10 tratadas após 24h (TFD). ....	59

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Singlete
<sup>3</sup> O <sub>2</sub>	Oxigênio Triplete
ALPc	Alumínio Cloro Ftalocianina
ATR	Refletância Total Atenuada
B16-F10	Células da Linhagem de Melanoma Murino
BSA	Albumina Sérica Bovina
CLN	Carreadores Lipídicos Nanoestruturados
DAMPs	Padrões Moleculares Associados a Danos
DES	Solventes Eutéticos Profundos
DH	Diâmetro Hidrodinâmico
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
FGS	Fluido Gástrico Simulado
FIS	Fluido Intestinal Simulado
FS	Fotossensibilizante
FTIR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Observatory</i>
IC <sub>50</sub>	Concentração Inibitória de 50%
IL	Líquidos Iônicos
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LED	Diodo Emissor de Luz
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5- difeniltetrazólio
NaDES	Solvente Eutético Profundo Natural
NLS	Nanopartículas Lipídicas Sólidas
NLS-AIPc	Nanopartícula Lipídica Sólida contendo AIPc
NLS-AIPc-NaDE	Nanopartícula Lipídica Sólida contendo AIPc e NaDES

NLS-AIPc-NaDES-Liof	Nanopartícula Lipídica Sólida Branca contendo AIPc e NaDES liofilizada
NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res	Nanopartícula Lipídica Sólida Branca contendo AIPc e NaDES liofilizada e ressuspendida
NLS-Branca	Nanopartícula Lipídica Sólida Branca (sem o ativo)
NLS-Branca-NaDES	Nanopartícula Lipídica Sólida Branca contendo NaDES
NLS-Branca-NaDES-Liof	Nanopartícula Lipídica Sólida Branca contendo NaDES liofilizada
NLS-Branca-NaDES-Liof	Nanopartícula Lipídica Sólida Branca contendo NaDES liofilizada e ressuspendida
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
OPAS	Organização Pan-americana de Saúde
PBS	Tampão Fosfato Salino
PDI	Índice de Polidispersão
PIT	Temperatura de Inversão de Fases
PZ	Potencial Zeta
SEM	Erro Padrão da Média
SFB	Soro Fetal Bovino
SisGen	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TFD	Terapia Fotodinâmica
UV	Raios Ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1. Introdução .....</b>	<b>11</b>
1.1. Câncer .....	11
1.2. Melanoma .....	13
1.3. Tratamentos .....	14
1.4. Terapia Fotodinâmica (TFD).....	15
1.5. Nanotecnologia .....	18
1.6. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS).....	19
1.7. Via de Administração Oral .....	20
1.8. Solventes Verdes .....	21
1.9. Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NaDES) .....	22
<b>2. Justificativa .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Objetivos .....</b>	<b>24</b>
3.1. Objetivo Geral .....	24
3.2. Objetivos Específicos.....	24
<b>4. Material e Métodos .....</b>	<b>24</b>
4.1. Reagentes .....	24
4.2. Delineamento Experimental .....	25
4.3. Preparo do NaDES.....	26
4.4. Preparo das Nanopartículas Lipídicas Sólidas .....	27
4.4.1. NLS sem NaDES (NLS-Branca e NLS-AIPc) .....	27
4.4.2. NLS com NaDES.....	28
4.5. Congelamentos .....	28
4.6. Metodologias de Secagem das NLS .....	28
4.6.1. Secagem por concentração a vácuo .....	28
4.6.2. Secagem por rotaevaporação.....	29
4.6.3. Secagem por liofilização .....	29
4.7. Caracterização Físico-Química das NLS .....	29
4.7.1. Estabilidade coloidal.....	29
4.7.2. Espectroscopia de absorção e fluorescência.....	29
4.7.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR).....	30
4.7.4. Estabilidade em fluido gastrointestinal simulado .....	30
4.8. Caracterização morfológica das NLS .....	30
4.8.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão .....	30

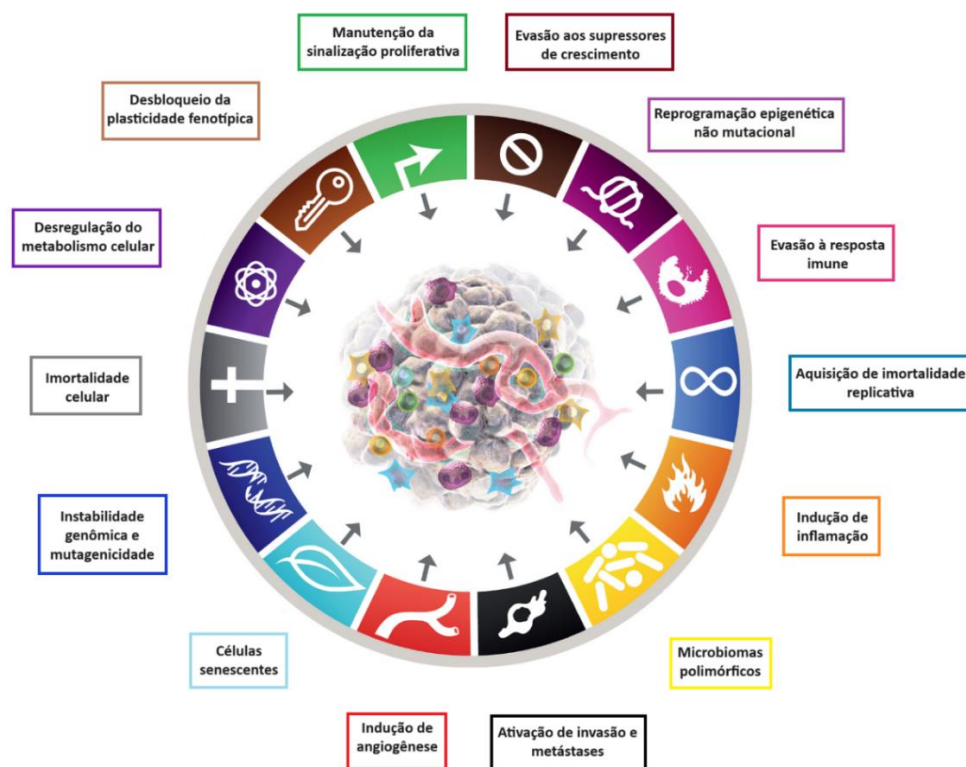
4.8.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	31
4.9.	Ensaio Biológicos.....	31
4.9.1.	<i>In Vitro</i> .....	31
4.9.1.1.	Manutenção das linhagens celulares.....	31
4.9.1.2.	Ensaio de Viabilidade Celular .....	31
4.10.	Análises Estatísticas .....	32
<b>5.</b>	<b>Resultados .....</b>	<b>32</b>
5.1.	Desenvolvimento das NLS.....	32
5.2.	Congelamento das NLS .....	33
5.3.	Metodologias de Secagem das NLS .....	35
5.3.1.	Secagem por concentração a vácuo .....	35
5.3.2.	Secagem por rotaevaporação.....	37
5.3.3.	Secagem por liofilização .....	39
5.4.	Caracterizações Físico-químicas .....	42
5.4.1.	Estabilidade Coloidal.....	42
5.4.2.	Espectroscopia de absorção e fluorescência.....	44
5.4.3.	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) .....	47
5.4.4.	Estabilidade em fluido gastrointestinal simulado .....	53
5.5.	Caracterização Morfológica das NLS .....	54
5.5.1.	Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	54
5.5.2.	Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....	56
5.6.	Ensaio Biológicos <i>in vitro</i> .....	57
5.6.1.	Ensaio de viabilidade celular.....	57
<b>6.</b>	<b>Discussão .....</b>	<b>60</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusão .....</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>Perspectivas.....</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>Referências Bibliográficas .....</b>	<b>70</b>

# 1. Introdução

## 1.1. Câncer

Câncer, também chamado de neoplasia maligna, é um termo designado para abranger uma variedade de doenças que se manifestam conjuntamente resultando em uma proliferação rápida e descontrolada de células, que deixam de sofrer apoptose e se acumulam, formando uma massa celular denominada tumor<sup>1,2</sup>. Estas células surgem a partir de células normais que sofreram mutações em partes do material genético responsáveis pelo controle de atividades essenciais à manutenção do ciclo celular, como a proliferação e a diferenciação celular, além dos mecanismos indutores de morte. A depender das características que adquirem com o acúmulo de mutações, estas células podem se tornar capazes de invadir tecidos adjacentes e órgãos distantes em um processo denominado de metástase<sup>3,4</sup>.

Para que o processo de carcinogênese ocorra e o tumor se desenvolva, é necessário que, além da proliferação sustentada e evasão da morte, as células tumorais adquiram características essenciais para a progressão tumoral, como a imortalidade replicativa, evasão do sistema imune, desregulação do metabolismo energético, instabilidade genômica e mutabilidade, indução de angiogênese, dentre outras<sup>5,6</sup>, as quais foram denominadas Hallmarks do Câncer (Figura 1).



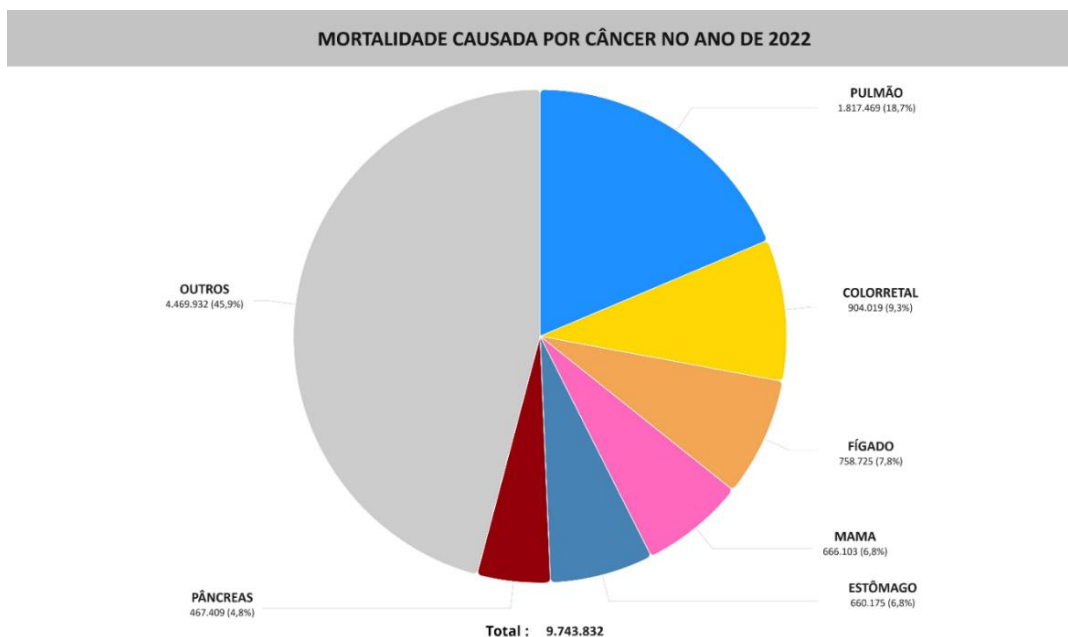
**Figura 1. Características fundamentais para o desenvolvimento do câncer.** A imagem ilustra as principais características adquiridas pelas células tumorais no processo de carcinogênese, que são: evasão aos supressores de crescimento, reprogramação epigenética não mutacional, evasão à resposta imune, aquisição de imortalidade replicativa,

indução de inflamação, microbiomas polimórficos, ativação de invasão e metástases, indução de angiogênese, células senescentes, instabilidade genômica e mutagenicidade, imortalidade celular, desregulação do metabolismo celular, desbloqueio da plasticidade fenotípica e manutenção da sinalização proliferativa. (Adaptado de Hanahan, 2022<sup>5</sup>).

Além dos Hallmarks do câncer, os fatores contribuintes para o desenvolvimento tumoral são diversos e possuem gatilhos internos e externos, resultantes da combinação entre predisposição genética, exposição a substâncias mutagênicas e hábitos de vida<sup>7</sup>. Segundo dados divulgados pela Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS) em 2020, aproximadamente um terço das mortes causadas por câncer se devem ao sobrepeso, alimentação pobre em frutas e verduras, sedentarismo, uso de álcool e tabagismo, sendo estes os principais fatores de risco relacionados à malignidade<sup>8</sup>.

O câncer tornou-se, portanto, um problema de cunho global e está hoje dentre as principais causas de morte no mundo inteiro, correspondendo a 9,7 milhões de mortes no ano de 2022, sendo os países de baixa renda os mais afetados (Figura 2), conforme dados obtidos pela *Global Cancer Observatory* (GLOBOCAN)<sup>9,10</sup>. No Brasil estimativas do *Instituto Nacional do Câncer* (INCA) apontam a ocorrência de 704 mil novos casos por ano, de 2023 a 2025, dos quais o mais incidente é o câncer de pele não melanoma<sup>11</sup>.

O impacto financeiro também é significativo, apenas no ano de 2022 os tratamentos oncológicos no Brasil custaram quase 4 bilhões de reais aos cofres públicos, isso considerando apenas os gastos federais, sem incluir todas as despesas municipais e estaduais, segundo estudos divulgados pela *Fundação Osvaldo Cruz* (FIOCRUZ) em parceria com o INCA<sup>12</sup>.



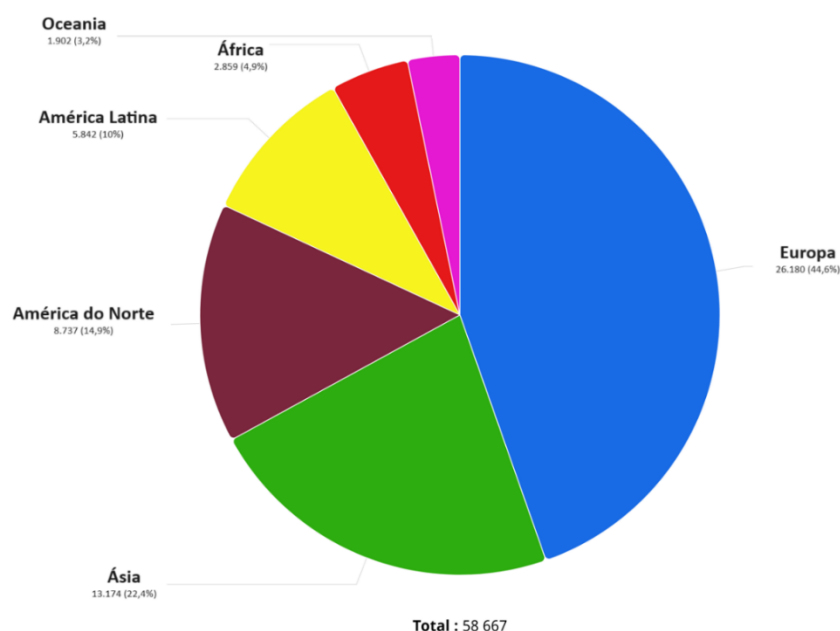
**Figura 2. Índice de mortalidade em decorrência de câncer no ano de 2022.** O gráfico mostra o número absoluto de mortes causadas por câncer em ambos os sexos e sem distinção de idade em todos os continentes. (Adaptado de OMS, 2022<sup>10</sup>).

## 1.2. Melanoma

O melanoma é um tipo de câncer que, em geral, se configura como uma neoplasia maligna derivada a partir dos melanócitos, que são células especializadas na produção de melanina, responsável pela pigmentação da pele, cabelos, olhos e mucosas. Apesar de estarem presentes majoritariamente na pele, na camada mais profunda da epiderme, os melanócitos também podem ser encontrados nos olhos, ouvidos e em algumas mucosas, o que pode caracterizar este câncer como cutâneo ou extracutâneo, sendo o melanoma cutâneo o mais incidente<sup>13-15</sup>.

Embora o câncer de pele não melanoma seja o mais incidente no Brasil, representando cerca de 30% de todas as malignidades, o melanoma cutâneo é atualmente a principal causa de morte entre os cânceres de pele, apresentando-se de forma bastante agressiva e com altas probabilidades de gerar metástase<sup>16,17</sup>. Segundo dados da GLOBOCAN, no ano de 2022 foram registradas quase 60 mil mortes em decorrência do melanoma cutâneo (Figura 3), atingindo majoritariamente a população europeia e asiática, que apresenta perfil caucasiano<sup>18</sup>.

### MORTALIDADE CAUSADA POR MELANOMA NO ANO DE 2022



**Figura 3. Mortalidade causada por melanoma em 2022.** O gráfico representa o número absoluto de mortes por continente em decorrência do câncer de pele melanoma para ambos os sexos e em todas as idades durante o ano de 2022. (Adaptado de OMS, 2022<sup>18</sup>).

O melanoma se manifesta através do surgimento de manchas, pintas e sinais pelo corpo, que em geral aumentam de tamanho conforme avança a doença. As causas relacionadas ao seu

desenvolvimento incluem principalmente a exposição intensa e acumulada aos raios ultravioletas, (UV), que induzem mutações no DNA dos melanócitos e levam à proliferação celular descontrolada destas células<sup>19</sup>. Entretanto, além da exposição solar, há outros fatores de risco para a ocorrência do melanoma, como a predisposição genética, o avanço da idade e a cor da pele, visto que a melanina possui ação protetora contra os raios UV. Aliado a todos estes fatores, encontra-se o hábito de vida de cada indivíduo, que exerce papel crucial no desenvolvimento tumoral de todas as neoplasias<sup>20,21</sup>.

A agressividade característica dessa neoplasia está fortemente relacionada à produção da melanina. Embora a principal função da melanina seja conferir proteção contra a radiação UV e o estresse oxidativo, este pigmento possui também papel essencial na progressão do melanoma. Isso ocorre porque durante a melanogênese, processo de síntese da melanina, as células sofrem várias alterações físicas, metabólicas, bioquímicas e moleculares, como o aumento da motilidade celular, o estímulo da glicólise e a produção de fatores indutores de hipóxia, que juntos tornam o microambiente mais propício e favorável para a progressão do tumor<sup>22,23</sup>. Por possuir característica de quelante de metais e ação radioprotetora, a melanina atua também reduzindo a sensibilidade das células do melanoma contra agentes quimioterápicos e contra a radioterapia, o que promove resistência às terapias existentes e dificulta o combate a este tipo de câncer<sup>24</sup>. Além disso, estudos demonstraram que altos níveis de pigmentação em melanomas está associado à redução na sobrevida global em pacientes com este tipo de câncer<sup>25</sup>.

Devido ao perfil altamente agressivo e metastático do melanoma, o diagnóstico ainda na fase inicial de desenvolvimento da doença se torna fundamental para um melhor prognóstico e sobrevivência dos pacientes. Entretanto, em alguns casos o diagnóstico ocorre de forma tardia ou incorreta, o que reduz a expectativa de vida dos acometidos com a doença. Ademais, mesmo com os avanços para a obtenção de diagnósticos com técnicas mais modernas e eficientes, o diagnóstico precoce do melanoma é ainda um desafio, de modo que se torna necessário a implementação de tratamentos mais assertivos e que proporcionem melhores condições para sobrevivência e recuperação dos pacientes<sup>26,27</sup>.

### **1.3. Tratamentos**

Após muito estudo e trabalho, a pesquisa científica mundial foi capaz de desenvolver variados tratamentos visando o combate ao câncer. No que diz respeito aos tumores sólidos, as principais abordagens terapêuticas convencionais compreendem a remoção cirúrgica, a quimioterapia, e a radioterapia, sejam individualmente ou em conjunto. No entanto, a estratégia terapêutica a ser utilizada

dependerá de muitos fatores, como o tipo de neoplasia, o estadiamento da doença, o estado de saúde do paciente e a localização do tumor<sup>28,29</sup>.

No caso do melanoma, a remoção cirúrgica do tumor e tecidos adjacentes é o tratamento mais indicado para os estágios iniciais da doença e normalmente requer tratamentos adjuvantes, como terapias direcionadas e imunoterapias. Para os casos metastáticos, a quimioterapia comumente apresenta-se como a primeira opção de tratamento, sendo a Dacarbazina um dos quimioterápicos mais utilizados. Este fármaco se trata de um agente alquilante que atua de forma sistêmica promovendo danos ao DNA das células e impedindo a sua replicação, o que resulta em morte celular. No entanto, a ação sistêmica e pouco seletiva deste fármaco não induz a morte apenas de células tumorais, mas também de células saudáveis do organismo, o que leva à ocorrência de demasiados efeitos adversos nos pacientes<sup>26,30</sup>. Além disso, estudos demonstraram que este tratamento apresentou atividade antitumoral pouco significativa, com baixa eficácia e sobrevida<sup>31</sup>.

Diante deste cenário, buscou-se alternativas mais viáveis para o tratamento do melanoma avançado, como a imunoterapia, que visa potencializar a resposta imunológica do organismo para que ele mesmo seja capaz de identificar e combater o câncer. Um exemplo desta terapia é o uso de inibidores de checkpoints imunológicos (anti-CTLA4 e anti-PD1), que atuam se ligando a proteínas das células tumorais e impedem que elas realizem o checkpoint imunológico e escapem da resposta imune<sup>32,33</sup>.

Apesar de todos os avanços alcançados nas terapias desenvolvidas, melhorando a sobrevivência e o prognóstico para os casos de melanoma, os tratamentos até então descritos e aprovados enfrentam ainda hoje muitos obstáculos, seja através da indução de efeitos adversos por toxicidade e da reincidência tumoral promovida pela baixa eficácia das terapias convencionais ou pela resistência medicamentosa, reações imunes e altos custos decorrentes das terapias mais modernas. Juntos, esses fatores culminam na depreciação da qualidade de vida dos pacientes, tornando-se necessário o desenvolvimento de tecnologias terapêuticas que minimizem os efeitos adversos e atuem com eficácia no tratamento do câncer<sup>34,35</sup>.

#### **1.4. Terapia Fotodinâmica (TFD)**

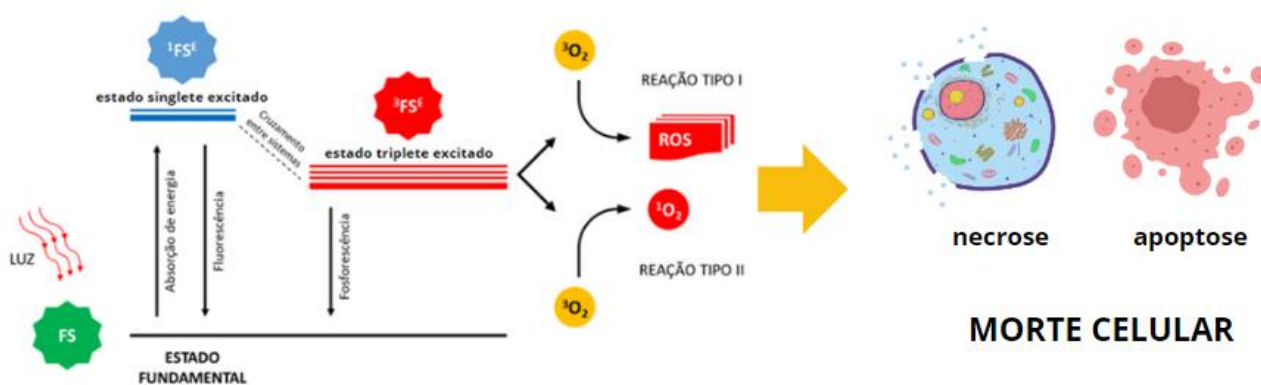
Na busca por estratégias terapêuticas alternativas para o tratamento do câncer, a TFD tem ganhado grande destaque nas últimas décadas. Apesar de ter surgido há mais de um século, foi apenas a partir de 1970 que a TFD passou a ser amplamente estudada, com os primeiros ensaios clínicos sendo realizados. Por se tratar de uma técnica minimamente invasiva e de baixa toxicidade sistêmica, essa

modalidade terapêutica tem apresentado grande potencial para tratamento de várias neoplasias, em especial de tumores sólidos superficiais, como é o caso do melanoma<sup>36,37</sup>.

A TFD consiste em um tratamento local que resulta na destruição tecidual baseada na interação entre três componentes: um fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e o oxigênio molecular. O fotossensibilizador consiste em uma molécula que quando excitada em um comprimento de onda específico se torna capaz de absorver energia luminosa e convertê-la em energia química. Quando isso ocorre, o FS é ativado e gera uma série de reações químicas que convertem o oxigênio triplete ( $^3\text{O}_2$ ) em oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), gerando espécies reativas de oxigênio, moléculas instáveis e extremamente reativas que induzem danos irreversíveis no tecido alvo e promovem a morte celular, seja por necrose ou apoptose<sup>38,39</sup> (Figura 4).

As reações resultantes da TFD podem ser classificadas em dois tipos, sendo que na reação do tipo I o FS excitado interage com moléculas orgânicas presentes nas células e com o oxigênio presente ao redor, de modo que ocorre a transferência de elétrons e conseqüentemente, a produção de espécies reativas de oxigênio, como radicais hidroxilas, peróxido de  $\text{O}_2$ , além de ânions superóxidos. Já nas reações do tipo II, o FS transfere energia diretamente para o oxigênio molecular, que é rapidamente convertido em oxigênio singlete, o que permite com que a reação seja mais rápida do que a transferência de elétrons e por isso mais comum de ocorrer<sup>40,41</sup>.

Além da destruição do tumor através da morte de células cancerosas a TFD promove também danos à vasculatura tumoral. A depender do tipo de morte celular, esses processos resultam na liberação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs), os quais podem auxiliar na ativação da resposta imune contra o tumor, o que mostra que a TFD é um processo extremamente dinâmico e complexo, plausível de ser direcionado a muitas aplicações<sup>42,43</sup>



**Figura 4. Esquema representativo do mecanismo de ação da Terapia Fotodinâmica.** A ilustração demonstra as trocas energéticas que ocorrem durante a TFD, em que o fotossensibilizante (FS) é excitado e leva à produção de espécies reativas de oxigênio (reação do tipo I) e oxigênio singlete (reação do tipo II), gerando a morte celular. (Adaptado de Santos, 2018<sup>44</sup>).

Entretanto, mesmo diante de tamanhas vantagens em relação aos tratamentos já estabelecidos, alguns desafios impõem grandes limitações à aplicação da TFD. Dentre os desafios mais notáveis estão: penetração suficiente da luz e a baixa biodisponibilidade dos FS, resultante de sua baixa solubilidade em água, o que acaba comprometendo a eficácia da terapia<sup>45,46</sup>.

Para superar tais limitações foi estabelecida uma “janela terapêutica” de tratamento, que consiste em utilizar fontes de luz com comprimento de onda entre 600 nm e 800 nm, pois permitem maior penetração tecidual, além de proporcionar energia suficiente para a ocorrência das reações<sup>47,48</sup>.

As ftalocianinas são exemplos de fotossensibilizantes de segunda geração que se encontram dentro desta janela, apresentando alto potencial terapêutico, dentre as quais se destaca a alumínio cloro ftalocianina (AlPc). A AlPc é amplamente utilizada no tratamento do melanoma, principalmente devido à sua facilidade em ser captada e retida pelas células neoplásicas, além de apresentar alto rendimento na geração de oxigênio singlete. Entretanto, apesar de serem bons agentes fotossensibilizantes, as ftalocianinas apresentam baixa solubilidade em meio aquoso, o que compromete a sua atividade fotodinâmica quando administradas em sistemas biológicos<sup>49,50</sup>.

No tratamento de melanoma a TFD tradicional também enfrenta obstáculos que tornam a sua aplicação clínica ainda discutível. A resistência à TFD apresentada pelo melanoma se dá principalmente devido a alguns fatores, são eles: (1) a presença da melanina, que atua protegendo fisicamente as células contra a irradiação do LED, além de agir também como antioxidante, captando os radicais livres de modo que eles não atinjam as células alvo, (2) a perda de direcionamento dos FS realizada pelos melanosomos (vesículas armazenadoras de melanina), que aprisionam os FS em seu interior e (3) os defeitos nas vias apoptóticas, decorrentes da dificuldade da terapia atuar com eficácia diante dos mecanismos protetores das células<sup>51,52</sup>.

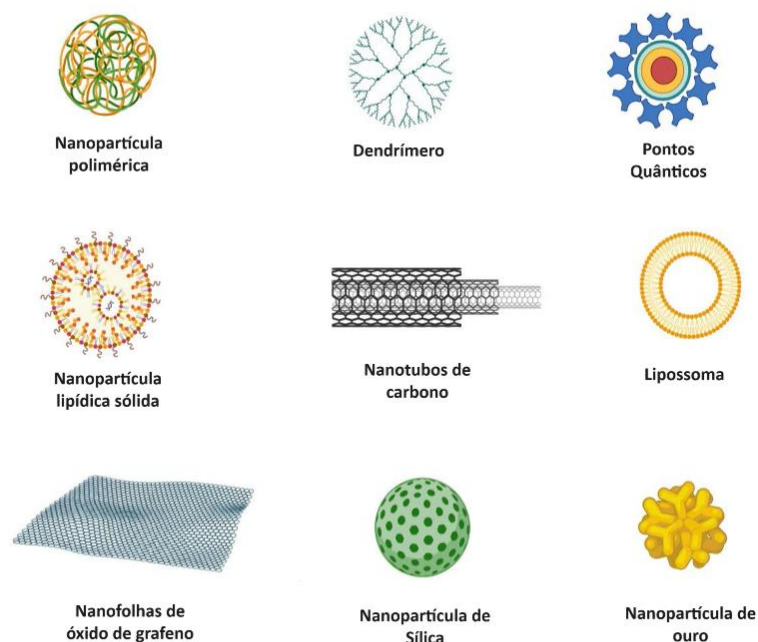
Diante disso, torna-se essencial a busca por estratégias que atenuem os desafios apresentados pela TFD frente ao tratamento do melanoma. Assim, o encapsulamento de fármacos através da nanotecnologia surge como ferramenta fundamental para potencialização da atividade terapêutica dos agentes fotossensíveis utilizados na TFD, dando origem à terceira geração de fotossensibilizantes<sup>53,54</sup>. Os fotossensibilizantes de terceira geração são aqueles associados com nanocarreadores, responsáveis por manter sua atividade em meio aquoso e melhorar seu direcionamento para a região alvo, aumentando a afinidade pelo tecido tumoral<sup>55</sup>.

## 1.5. Nanotecnologia

O conceito da nanotecnologia foi introduzido pela primeira vez ainda no ano de 1959 pelo físico Richard Feynman, no entanto, com o avanço da ciência e aprimoramento desta tecnologia, este termo ganhou várias conceituações ao longo do tempo. De modo geral, a nanotecnologia consiste na compreensão, manipulação, controle e utilização da matéria em escala nanométrica visando o desenvolvimento de estruturas com propriedades físicas diferenciadas, as nanopartículas<sup>56,57</sup>.

As nanopartículas podem ser definidas como estruturas que apresentam entre 1 e 1000 nm de diâmetro. Devido à grande área de superfície que possuem, estas nanoestruturas apresentam novas propriedades físicas e químicas que lhes conferem inúmeras vantagens. Dentro da medicina a nanotecnologia tem sido amplamente utilizada para neoplasias, seja através do diagnóstico ou tratamento, permitindo melhor solubilidade e liberação controlada de fármacos, redução das doses utilizadas, além de maior direcionamento para a região tumoral<sup>58,59</sup>.

A aplicação das nanopartículas requer propriedades específicas diferentes, que provêm, em grande parte, pelo material que compõe a nanoestrutura. Assim, as nanopartículas se classificam em diferentes tipos, a depender de seu formato e composição: nanopartículas metálicas, magnéticas, poliméricas, lipídicas, dentre outras (Figura 5)<sup>60,61</sup>.

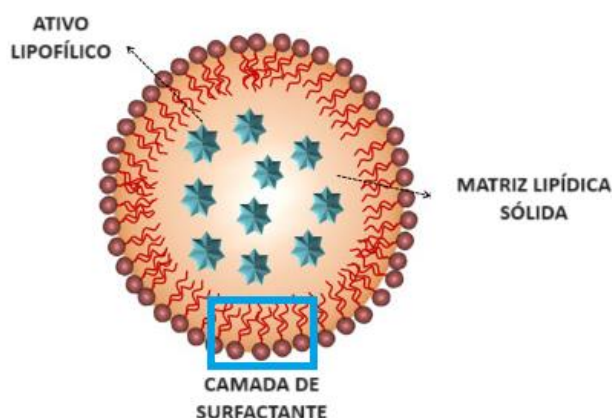


**Figura 5. Diferentes tipos de nanomateriais.** Representação gráfica dos diferentes tipos de nanomateriais utilizados em aplicações médicas, incluindo nanopartículas orgânicas, inorgânicas e nanopartículas híbridas. (Adaptado de Gavass *et al.*, 2021<sup>60</sup>).

Devido às propriedades dos lipídios, como a biocompatibilidade e biodegradação, a encapsulação de fármacos em nanopartículas lipídicas, como lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS) e carreadores de lipídios nanoestruturados (CLN) tem apresentado resultados promissores para o desenvolvimento de terapias anticâncer<sup>62,63</sup>.

### 1.6. Nanopartículas Lipídicas Sólidas (NLS)

As nanopartículas lipídicas sólidas são sistemas coloidais que possuem partículas com tamanho médio abaixo de 1000 nm<sup>64</sup>. Em geral possuem estrutura esférica e são constituídas por uma matriz de lipídio sólido à temperatura ambiente estabilizada por uma ou mais camadas de surfactante e água, permitindo a incorporação de fármacos e ativos tanto hidrofílicos quanto lipofílicos (Figura 6). O componente lipídico em geral pode ser triacilglicerídeos, ácidos graxos ou ceras<sup>65,66</sup>.



**Figura 6. Representação de nanopartícula lipídica sólida.** A ilustração representa as principais estruturas das NLS, no centro um núcleo sólido encapsulando um ativo lipofílico, que fica incorporado na matriz e ao redor a camada de surfactante estabilizando a estrutura. O surfactante fica com a parte polar da molécula voltada para fora e a calda apolar voltada para dentro da estrutura, interagindo com a parte lipídica. (Adaptado de Javadzadeh & Yaqoubi, 2017<sup>67</sup>).

As NLS foram descritas pela primeira vez no início da década de 90 e surgiram como uma alternativa ao uso de alguns nanocarreadores até então existentes, principalmente as nanopartículas, poliméricas, os lipossomas e as nanoemulsões<sup>68</sup>. Dentre as vantagens apresentadas pelas NLS e que superam as limitações apresentadas por esses nanocarreadores estão a sua baixa toxicidade em sistemas biológicos, facilidade de escalonamento, alta biocompatibilidade e biodegradabilidade, além de grande estabilidade física, proporcionadas por sua matriz lipídica, que permite adequado aprisionamento dos ativos encapsulados<sup>69,70</sup>.

Por esses motivos as NLS passaram a ser amplamente utilizadas como carreadores para a entrega de fármacos voltados para o tratamento de câncer, permitindo uma liberação sustentada destes medicamentos através de variadas vias de administração, incluindo a administração oral<sup>71-73</sup>.

### **1.7. Via de Administração Oral**

A via de administração oral consiste em toda administração de medicamentos que é realizada através da deglutição ou inserção direta no estômago através de sondas<sup>74</sup>. Dentre as principais vias de administração voltadas para o tratamento do câncer (oral, intravenosa, subcutânea, intramuscular e tópica), representadas na Tabela 1.

A via de administração oral se caracteriza como uma das mais desejáveis em virtude das diversas vantagens que apresenta, como o fato de ser indolor, não invasiva, de fácil administração, permitir a flexibilidade de dosagens, custos mais baixos, além da praticidade da automedicação, o que gera maior comodidade e adesão dos pacientes ao tratamento<sup>75,76</sup>.

Entretanto, apesar dos benefícios dessa administração, os medicamentos acabam enfrentando barreiras fisiológicas do trato gastrointestinal, como a baixa solubilidade e degradação, que podem resultar na diminuição de sua eficácia terapêutica. Assim, o nanocarreamento de fármacos para a administração oral surge como alternativa para superar tais barreiras e viabilizar a entrega e absorção de fármacos em sistemas vivos, permitindo sua chegada ao tecido alvo<sup>77,78</sup>.

**Tabela 1. Vantagens e desvantagens apresentadas pelas diferentes vias de administração voltadas para o tratamento do câncer (via oral, via intravenosa, via subcutânea, via intramuscular e via tópica).**

	VANTAGENS	DESvantagens
VIA ORAL	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Facilidade de autoadministração</li> <li>•Menor custo</li> <li>•Melhor adesão ao tratamento</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Variabilidade na absorção</li> <li>•Dificuldade de entrega no tecido alvo</li> </ul>
VIA INTRAVENOSA	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Rápida distribuição</li> <li>•Controle da dose</li> <li>•Tratamento sistêmico (adequado para metástases)</li> <li>•Absorção consistente</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Efeitos colaterais sistêmicos</li> <li>•Dor</li> <li>•Necessidade de acesso venoso</li> <li>•Risco de infecção</li> <li>•Muitas vezes requer hospitalização</li> <li>•Alto custo</li> <li>•Menor adesão ao tratamento</li> </ul>
VIA SUBCUTÂNEA	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Facilidade de autoadministração</li> <li>•Absorção gradual (mais lenta e prolongada)</li> <li>•Não necessita de acesso venoso</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Absorção variável</li> <li>•Limitação em doses elevadas</li> <li>•Risco de reações locais (dor, vermelhidão e inchaço)</li> <li>•Necessidade de variar os locais de aplicação com frequência</li> </ul>
VIA INTRAMUSCULAR	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Absorção moderada</li> <li>•Administração intermitente (menor frequência)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Dor e desconforto</li> <li>•Limitação em doses elevadas (volume limitado)</li> <li>•Variabilidade na absorção (depende da localidade)</li> </ul>
VIA TÓPICA	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Ação direta no sítio-alvo</li> <li>•Redução de efeitos secundários</li> <li>•Fácil adesão à pele</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Irritações e reações alérgicas</li> <li>•Restrições pelas propriedades físico-química dos fármacos</li> <li>•Menor praticidade</li> </ul>

### 1.8. Solventes Verdes

Os solventes verdes compreendem uma geração de solventes que emergiu da busca pela redução dos fortes impactos ambientais promovidos pelo uso de solventes derivados de recursos fósseis. Por conta disso, eles se apresentam como solventes derivados de fontes renováveis, plantas, biomassa e organismos vivos em geral, o que os torna ecologicamente corretos e mais sustentáveis<sup>79,80</sup>.

Para receberem essa classificação, estes solventes devem apresentar algumas características, como: biodegradabilidade, baixa ou nula toxicidade, baixa volatilidade, reciclabilidade e um custo baixo<sup>81</sup>.

Ao longo dos anos o conceito e as classificações de solvente verde evoluíram bastante, de modo que para atingir a melhor versão destes solventes foi necessário passar por algumas de suas gerações. Assim, dentre os variados tipos de solventes verdes, destacam-se três classificações, de modo que cada um deles surgiu para resolver as problemáticas da geração anterior. São eles: os Líquidos Iônicos (IL), os Solventes Eutéticos Profundos (DES) e os Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NaDES)<sup>82,83</sup>.

Os líquidos iônicos começaram a ser estudados no início do século XX e são definidos como soluções líquidas de compostos iônicos com ponto de fusão inferior a 100°C. Foram majoritariamente utilizados para extração de diversas substâncias, mas apesar de apresentarem várias vantagens em relação ao uso de solventes orgânicos, como o fato de não serem inflamáveis nem voláteis mantendo sua estabilidade, os IL apresentaram toxicidade considerável, além de problemas com a biodegradabilidade<sup>84,85</sup>.

Para lidar com essa problemática, em 2004 os solventes eutéticos profundos ganharam destaque. Os DES podem ser definidos como misturas de dois ou três componentes que quando misturados em proporções molares adequadas interagem principalmente através ligações de hidrogênio e abaixam consideravelmente o ponto de fusão da mistura resultante<sup>86,87</sup>. Devido ao seu baixo custo, fácil preparo, menor toxicidade e biodegradabilidade, os DES se tornaram promissores substitutos para os IL. No entanto, a presença de alguns sais metálicos nas composições dos DES os impediu de serem totalmente sustentáveis, apresentando ainda alguma toxicidade<sup>88</sup>. Foi assim que se abriu espaço para a mais recente geração dos solventes verdes, os NaDES.

### **1.9. Solventes Eutéticos Profundos Naturais (NaDES)**

Os NaDES são solventes resultantes da mistura de variados componentes orgânicos do metabolismo primário dos seres vivos, como ácidos, açúcares, derivados de colina e aminoácidos. Quando misturados a proporções molares específicas, estes metabólitos formam uma mistura líquida e homogênea à temperatura ambiente, que apresenta ponto de fusão muito mais baixo do que quando se compara os componentes isoladamente, que possuem ponto de fusão muito alto. É isso que os caracteriza como uma mistura eutética. Essa propriedade confere aos NaDES características que os tornam muito interessantes, pois permite que eles possam solubilizar muitos componentes de difícil solubilidade, incluindo substâncias insolúveis em água<sup>87,89</sup>.

Os NaDES se diferenciam dos DES principalmente pela origem natural dos componentes que são utilizados em suas misturas. Por possuírem origem orgânica, são vistos como potencial alternativa

ao uso de solventes tóxicos, podendo substituí-los em várias situações e atuar de forma mais biodegradável e biocompatível, motivo que os colocam na geração mais recente dos solventes verdes<sup>90</sup>.

Os NaDES são formados através de interações intermoleculares entre os componentes por meio de ligações de hidrogênio e dentre os componentes escolhidos, um deve ser o acceptor de hidrogênio e outro o doador de hidrogênio na ligação, sendo este deslocamento de carga responsável por abaixar o ponto de fusão da mistura<sup>91</sup>.

A ampla possibilidade de formação de NaDES proporcionada pela combinação entre doadores e aceptores de hidrogênio, assim como a alteração nas proporções de água permitem com que estes solventes possam ser desenvolvidos de forma direcionada para as mais diversas aplicações. Além de atuarem solubilizando diversas substâncias, os NaDES podem ser usados também para a extração de ativos e até como crioprotetores, pois os componentes que o formam são encontrados em seres vivos em condições extremas e auxiliam na proteção contra o frio, por exemplo<sup>92,93</sup>.

Entretanto, apesar de tamanhas vantagens, não há ainda na literatura descrição prévia do uso de NaDES associado à formulação de nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), de modo que o presente trabalho buscou também explorar melhor as características destes solventes nas formulações deste tipo de nanocarreadores.

## 2. Justificativa

Apesar dos avanços obtidos no tratamento contra o melanoma, ele ainda se configura como uma doença extremamente agressiva e de alta letalidade, de modo que as estratégias terapêuticas atualmente utilizadas promovem diversos efeitos colaterais que resultam em baixa qualidade de vida dos pacientes, sendo necessário, portanto, a busca por abordagens mais eficazes para conter a progressão e promover a cura da doença.

Neste sentido, a administração oral de fotossensibilizantes de terceira geração associada à terapia fotodinâmica se coloca como implementação fundamental no tratamento oncológico, sendo minimamente invasiva e mais conveniente ao paciente, o que promove maior adesão ao tratamento, além de reduzir gastos com material de aplicação e profissionais para administração do fármaco, aliviando o sistema de saúde.

Entretanto, apesar das vantagens da administração oral, estudos mostraram que a ALPc nanocarreada atinge principalmente órgãos como linfonodos, pulmão, fígado, baço e rins, e apesar de chegar ao tumor, chega em baixas concentrações, inviabilizando uma terapia *in vivo* de alta eficácia<sup>94-96</sup>. Tal fato não pode ser contornado com o aumento do volume na administração do fármaco, uma vez

que o limite máximo de aplicação por gavagem estabelecido por regulamentação é de 10 mL/kg de peso corpóreo<sup>97</sup>.

Assim, uma terapia que utilize nanossistemas concentrados, incorporados em veículos para a administração oral de fármacos fotossensibilizantes, direcionando melhor a entrega, reduzindo a toxicidade e, conseqüentemente, os efeitos colaterais característicos de tratamentos convencionais justifica o presente estudo, uma vez que nanocarreadores submetidos a processos que aumentem sua concentração final na região tumoral podem gerar resultados mais substanciais, além de levar maior comodidade e qualidade de vida aos pacientes. Neste sentido, o uso de solventes verdes associado a NLS surge também como uma alternativa inovadora e que promove alto valor agregado ao tratamento proposto, uma vez que consiste em uma metodologia mais limpa e de menor toxicidade.

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Desenvolver uma plataforma para administração oral a partir de NLS contendo AlPc (fotossensibilizante de 3ª geração) e associadas a solvente verde, visando promover a concentração dessas partículas, possibilitando maior eficácia no tratamento de melanoma a partir da TFD.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas contendo NaDES em sua formulação;
- Associar às nanopartículas a AlPc, criando um fotossensibilizante de 3ª geração;
- Padronizar protocolos de secagem das nanopartículas lipídicas sólidas por vácuo e centrifugação, liofilização e rotaevaporação, a fim de concentrar a formulação;
- Caracterizar as nanopartículas obtidas quanto às propriedades físico-químicas e morfológicas, de modo a compreender os efeitos da adição do NaDES à formulação;
- Avaliar a estabilidade coloidal das nanopartículas desenvolvidas em fluido gastrointestinal simulado, visando compreender o seu potencial como plataforma para administração oral;
- Avaliar a viabilidade celular de células da linhagem B16-F10 mediante tratamento com as nanopartículas desenvolvidas, comparando os efeitos da metodologia de concentração na toxicidade das nanopartículas.

### **4. Material e Métodos**

#### **4.1. Reagentes**

Os reagentes utilizados para a realização dos experimentos deste projeto estão listados na tabela abaixo (Tabela 2).

**Tabela 2. Reagentes e produtos utilizados para a realização dos experimentos.**

<b>Reagentes</b>	<b>Fabricante</b>
Manteiga de Murumuru ( <i>Astrocaryum murumuru</i> )	Amazon Oil
Tetróxido de Ósmio	Electron Microscopy Science, EUA
Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM); Soro Fetal Bovino (SFB); Tripsina 0,25% em EDTA	GIBCO, EUA
Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio (MTT)	Invitrogen, EUA
Tampão Fosfato Salino (PBS)	Laborclin, Brasil
Ácido Acético; Ácido Cítrico; Brij® O10; Cloreto de Colina; Dimetilsulfóxido (DMSO); Etanol; Penicilina; Streptomicina; Pepsina; Pancreatina	Sigma-Aldrich, EUA
Glicerol	Vetec

#### **4.2. Delineamento Experimental**

Os experimentos conduzidos nesse trabalho estão esquematizados na Figura 7 abaixo.

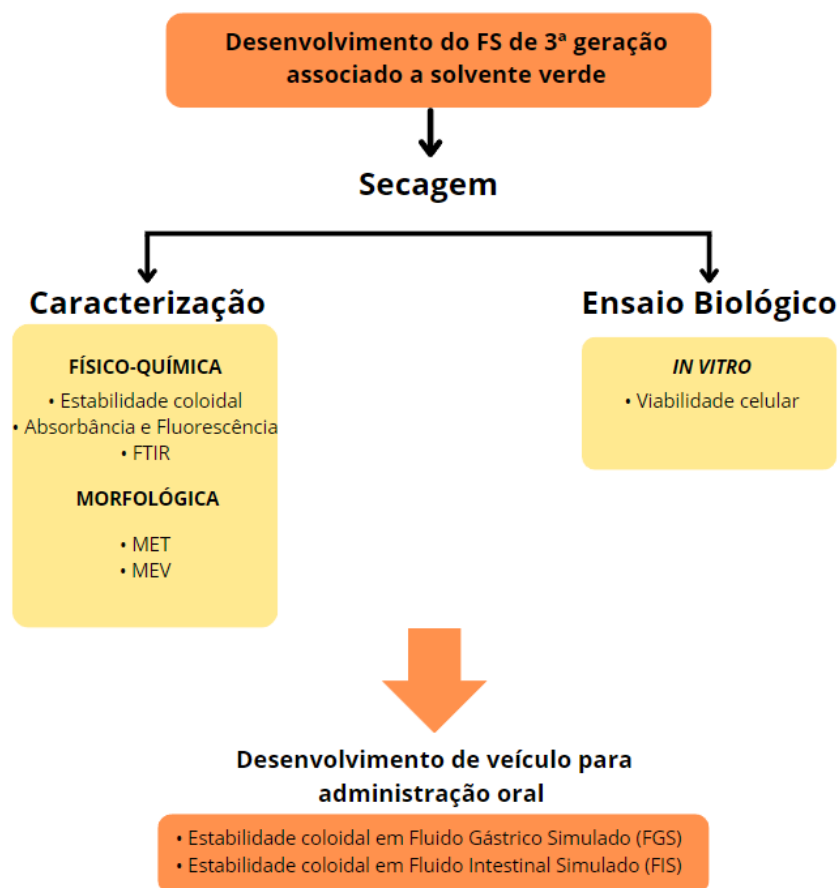


Figura 7. Diagrama do delineamento experimental desenvolvido no trabalho.

### 4.3. Preparo do NaDES

O NaDES selecionado para a formulação das NLS desenvolvidas neste trabalho foi previamente desenvolvido e amplamente caracterizado por Silva, *et al.*, 2020<sup>98</sup>. A escolha deste solvente especificamente se justifica devido à metodologia de fácil preparo e baixo gasto energético, assim como a alta acessibilidade aos compostos que o integram. Por se tratar de um solvente bastante estudado e caracterizado, com metodologia de formulação já padronizada, o foco do presente trabalho não foi a caracterização do solvente, mas a compreensão dos efeitos de sua aplicação à formulação de NLS.

O NaDES utilizado para a formulação das NLS desenvolvidas apresenta em sua composição Cloreto de Colina, Glicerol e Ácido Cítrico na proporção molar de 0,5:2:0,5, além de 25% de água (v/v). Os reagentes foram pesados e a mistura agitada a 80°C durante 30 minutos até atingir um líquido de aspecto homogêneo. Posteriormente, a água foi acrescentada na proporção de 25%, conforme protocolo descrito por da Silva, *et al.*, 2020<sup>98</sup>.

#### 4.4. Preparo das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

Foram desenvolvidas para o trabalho quatro NLS, carreadoras ou não do fotossensibilizante AlPc. Destas, duas não apresentam NaDES em sua composição (NLS-Branca e NLS-AlPc) e duas apresentam NaDES em sua composição (NLS-Branca-NaDES e NLS-AlPc-NaDES), conforme explicitado na tabela abaixo (Tabela 3).

**Tabela 3. Nanopartículas desenvolvidas no projeto e os respectivos componentes nelas presentes.**

NLS	ÁGUA	MANTEIGA DE MURUMURU ( <i>Astrocaryum murumuru</i> )	TENSOATIVO (Brij® O10)	AlPc	NaDES
NLS-Branca	x	x	x		
NLS-Branca-NaDES	x	x	x		x
NLS-AlPc	x	x	x	x	
NLS-AlPc-NaDES	x	x	x	x	x

##### 4.4.1. NLS sem NaDES (NLS-Branca e NLS-AlPc)

As NLS foram preparadas utilizando a metodologia de temperatura de inversão de fase (do inglês- PIT, Phase Inversion Temperature), um método de baixa energia e baixo custo muito utilizada para a formulação de nanopartículas lipídicas<sup>99,100</sup>. As formulações foram realizadas com adaptações da metodologia previamente desenvolvida por Mello *et al.*, 2022<sup>101</sup>, em que a fase oleosa é composta por manteiga de Murumuru e tensoativo (Brij® O10) na proporção 2:1, respectivamente, o que corresponde a 7,5% p/v da formulação. A manteiga de Murumuru é proveniente da biodiversidade amazônica e por esse motivo o presente trabalho apresenta registro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número de cadastro A1563A6.

Para a formulação da NLS-Branca, a fase oleosa composta por manteiga de Murumuru e tensoativo Brij O10 (2:1) foi previamente aquecida a 65°C até a completa fusão dos componentes.

Posteriormente foram adicionados 40 mL de água destilada a 65°C e a mistura foi mantida sob agitação constante até atingir a temperatura de 80°C, momento em que é resfriada sob fluxo constante de água até atingir temperatura ambiente (25°C). Para as NLS-AIPc, o procedimento é o mesmo, entretanto, após a fusão da fase oleosa é adicionada a solução etanólica de AIPc, cuja concentração final na formulação é de 20 µM.

#### **4.4.2. NLS com NaDES**

Para a formulação das NLS contendo NaDES (NLS-Branca-NaDES e NLS-AIPc-NaDES) o protocolo é semelhante, entretanto neste preparo o solvente é adicionado à formulação (5 mL), o que ocorre na fase oleosa. Além disso, da fase aquosa é retirado o volume que se adiciona do solvente. Este protocolo foi aplicado para todas as concentrações do solvente testadas (1,25; 2,5%; 5%; 7,5%; 10%; 12,5%; 15%, 20%, 25%). Para as NLS-AIPc-NaDES o procedimento é o mesmo, entretanto, após a fusão da fase oleosa é adicionada a AIPc, cuja concentração final na formulação é de 20 µM.

#### **4.5. Congelamentos**

Para avaliar o efeito crioprotetor do NaDES nas formulações de NLS, foram testados três tipos de congelamento: lento (-20°C), rápido (-80°C) e ultrarrápido (-196°C). Para cada temperatura os parâmetros coloidais de Diâmetro Hidrodinâmico (DH), Índice de Polidispersão (PDI) e Potencial Zeta (PZ) foram avaliados após o congelamento das NLS por técnica de espalhamento dinâmico da luz (do inglês-DLS, Dynamic Light Scattering), no equipamento ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA).

#### **4.6. Metodologias de Secagem das NLS**

As NLS foram submetidas a procedimentos de secagem visando a concentração de nanopartículas na amostra por meio de três metodologias distintas: concentração por vácuo e centrifugação, rotaevaporação e liofilização.

##### **4.6.1. Secagem por concentração a vácuo**

Triplicatas de amostras de NLS-Branca, NLS-ALPc e NLS-Branca-NaDES contendo 1000 µL foram submetidas à secagem por vácuo e centrifugação no equipamento Spped Vac Concentrator Savant SPD2010® e retiradas a cada hora durante um período de sete horas. Após a secagem as amostras foram diluídas em água destilada (1:10) e analisadas em ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA) para avaliação do DH, PDI e PZ.

#### **4.6.2. Secagem por rotaevaporação**

Amostras de 10 mL das NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES e NLS-AIPc-NaDES em triplicata foram submetidas a secagem por evaporação de solvente no equipamento Rotaevaporador® R-II a 250 mbar de pressão durante 5h. Após a rotaevaporação as amostras foram ressuspensas em volume original e diluídas em água destilada (1:10) para a avaliação do DH, PDI e PZ.

#### **4.6.3. Secagem por liofilização**

Triplicatas contendo 40 mL de amostra das das NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES e NLS-AIPc-NaDES foram previamente congeladas a -20°C e submetidas à desidratação por vácuo e baixas temperaturas em Liofilizador L101® por 72h, até sua completa desidratação. Posteriormente as amostras liofilizadas foram armazenadas em dessecador contendo sílica. Para a avaliação do DH, PDI e PZ 10 mg da amostra liofilizada foram ressuspensas em 1000 µL de água destilada.

### **4.7. Caracterização Físico-Química das NLS**

#### **4.7.1. Estabilidade coloidal**

As formulações de NLS foram avaliadas pelo período de 365 dias sob quatro condições de armazenamento: temperatura ambiente (25°C), resfriamento (4°C), aquecimento (37°C) e congelamento (-20°C). Para a determinação dos parâmetros coloidais de DH, PDI e PZ foi utilizado o equipamento ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA) e cubetas poliestireno. A análise de DH e PDI foi realizada pela técnica de espalhamento dinâmico da luz e o PZ por mobilidade eletroforética. Para a análise todas as amostras foram diluídas na proporção de 1:10 em água destilada.

#### **4.7.2. Espectroscopia de absorção e fluorescência**

Os espectros de absorbância e fluorescência foram traçados na região visível do espectro eletromagnético com valores de absorbância mensurados mediante varredura espectral entre os comprimentos de onda de 350-750 nm, apresentando resolução de 1 nm. A fluorescência foi mensurada sob excitação de 350 nm e emissão entre 360-750 nm, com resolução de 1 nm.

Todas as NLS desenvolvidas foram avaliadas em dispersões aquosas na concentração de 5 µM (concentração referente à AIPc). Para a AIPc os espectros foram traçados em meio aquoso e em etanol e para o NaDES, em meio aquoso, ambos seguindo a mesma diluição das NLS. Para o ensaio foram utilizadas placas de 96 poços transparentes (absorbância) e pretas (fluorescência), nas quais foram

depositados, em triplicata, 200  $\mu\text{L}$  de cada amostra. As análises foram conduzidas no espectrofotômetro Varioskan - ThermoFisher, EUA.

#### ***4.7.3. Espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)***

As amostras foram preparadas e depositadas em cristal de diamante em estados físicos distintos, devido suas especificidades, sendo estes: (i) sólido (ácido cítrico, cloreto de colina e AlPc), (ii) líquido (glicerol, NaDES, misturas físicas e os nanossistemas não liofilizados) e (iii) com aspecto pastoso (nanossistemas liofilizados). Os espectros foram adquiridos no modo refletância total atenuada (ATR), utilizando o espectrofotômetro Vertex 70 (Bruker Corporation, EUA) e processados com o software OPUS 7.2 (Bruker Corporation, EUA), na região compreendida entre 4.000 a 500  $\text{cm}^{-1}$ , com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$  e 32 scans. Os dados foram analisados no software OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, EUA).

#### ***4.7.4. Estabilidade em fluido gastrointestinal simulado***

A fim de se avaliar o comportamento das NLS diante das condições proporcionadas pela via de administração oral, foram preparados dois meios para a estabilidade em fluido gastrointestinal simulado: o fluido gástrico simulado (FGS) e o fluido intestinal simulado (FIS). O preparo de FGS foi realizado com NaCl, HCl, pepsina e água, ao passo que o preparo de FIS envolveu  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pancreatina e água, conforme descrito por Han, 2012<sup>102</sup>.

Para o ensaio de estabilidade em fluido gastrointestinal simulado as NLS foram adicionadas ao FGS na proporção de 1:5 e incubadas em banho maria a 37°C com agitação lenta por 2h. Após a digestão simulada em FGS, esta mistura foi adicionada ao FIS na proporção de 1:1, onde foi mantida por 4h. Amostras de 1 mL de NLS foram coletadas nos tempos de 2h, 4h e 6h de digestão e diluídas em água destilada (1:10) para avaliação dos parâmetros coloidais em ZetaSizer SZ90 (Malven, EUA).

### **4.8. Caracterização morfológica das NLS**

#### ***4.8.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão***

As NLS foram previamente diluídas na proporção de 1:200 (v/v) em água destilada e 5  $\mu\text{L}$  de amostra foram depositados em grids de cobre de 400 mesh revestidos com filme de Formvar. Após 24h de deposição, as amostras foram contrastadas com vapor de tetróxido de ósmio a 2% durante dois minutos e posteriormente analisadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1011 (Tóquio, Japão) operado com 80 kV de tensão.

#### **4.8.2. Microscopia Eletrônica de Varredura**

Devido à resolução limitada do microscópio utilizado, apenas as NLS liofilizadas e ressuspensas, por apresentar maior diâmetro hidrodinâmico, foram analisadas neste equipamento. A fim de se evitar análises equivocadas com a fita de carbono, os grids de cobre de 400 mesh revestidos com filme de Formvar foram colocados sobre a fita de carbono em stubs metálicos e somente depois as amostras foram depositadas. As NLS liofilizadas foram previamente ressuspensas e diluídas na proporção de 1:200 (v/v) em água destilada e depositadas em volume de 5 µL no grid sobre o stub, sendo posteriormente contrastadas com vapor de tetróxido de ósmio a 2% durante 5 minutos. Após 24h da deposição, as amostras foram metalizadas por um minuto no Metalizador SCD 500 (LEICA, Germany) e depois analisadas no Microscópio Eletrônico de Varredura JSM-7001F (JEOL, Japan).

### **4.9. Ensaio Biológicos**

#### **4.9.1. In Vitro**

##### **4.9.1.1. Manutenção das linhagens celulares**

Visando o tratamento do melanoma, a linhagem celular utilizada para o trabalho foi a B16-F10 (ATCC CRL-6475<sup>TM</sup>), de melanoma murino, cultivadas em meio DMEM suplementado com 1% de solução antibiótica e 10% de soro fetal bovino (SFB). As células foram mantidas em incubadora umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> à temperatura de 37°C. Repiques foram realizados com solução 0,25% de tripsina-EDTA (Gibco, USA).

##### **4.9.1.2. Ensaio de Viabilidade Celular**

Para avaliar a toxicidade celular das NLS desenvolvidas foi realizado ensaio de viabilidade celular com células B16-F10. Para o tratamento 3x10<sup>3</sup> células foram semeadas por poço em placas de 96 poços e após 24h foram tratadas por 15 minutos com diferentes concentrações (0,002; 0,02; 0,2; 2; 20; 200 e 2000 nM) das NLS, NaDES e AIPc em sua forma livre ou foram mantidas apenas com meio de cultivo (grupo controle). As concentrações utilizadas referem-se à concentração de AIPc, sendo que para os tratamentos que não envolveram o fármaco, foi utilizado o volume correspondente.

Para o ensaio no escuro os grupos de tratamento envolveram as NLS-Branca, NLS-Branca-NaDES, NLS-AIPc, NLS-AIPc-NaDES, NaDES, AIPc em etanol, além do grupo controle e para o ensaio com TFD os grupos de tratamento envolveram NLS-Branca, NLS-Branca-NaDES, NLS-AIPc, NLS-AIPc-NaDES, NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res, AIPc em etanol e o grupo controle. Após os 15

minutos de tratamento, as células foram lavadas com PBS e mantidas no escuro (para o caso do ensaio sem uso de TFD).

Para os ensaios utilizando a TFD, as células após tratadas foram irradiadas por 10 min, a 10 cm de distância com luz LED (660 nm a 25,9 J/cm<sup>2</sup> de densidade de energia). Após este procedimento, as células foram incubadas a 37°C por 24h. Após 24h do tratamento as células foram incubadas por 4h com solução de MTT (0,5 mg/mL em meio de cultura). Posteriormente toda a solução de MTT foi retirada e foram adicionados 200 µL de DMSO em cada um poço para a dissolução dos cristais de formazan e determinação da viabilidade celular. Para este ensaio foi utilizado como base protocolo já estabelecido pelo grupo de pesquisa, sendo o tempo de tratamento e as configurações da TFD previamente estudadas por Mello, *et al.*, 2022<sup>101</sup>, onde constatou-se que o tempo de internalização das NLS ocorre após 15 minutos de tratamento.

A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio padrão por brometo de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) segundo as recomendações do fabricante e os valores de absorbância foram obtidos por espectrofotômetro (Varioskan - ThermoFisher, EUA), com leitura em comprimento de onda de 595 nm. Para o cálculo da porcentagem de inibição comparou-se a densidade celular das células tratadas com a das células controle no mesmo período de incubação. Ressalta-se que o experimento foi realizado em quadruplicada e com três eventos independentes.

#### **4.10. Análises Estatísticas**

Os dados provenientes dos resultados obtidos foram submetidos a análises estatísticas com testes específicos de confiança estatística de 95% e analisados em programa GraphPad Prism® 9.0.

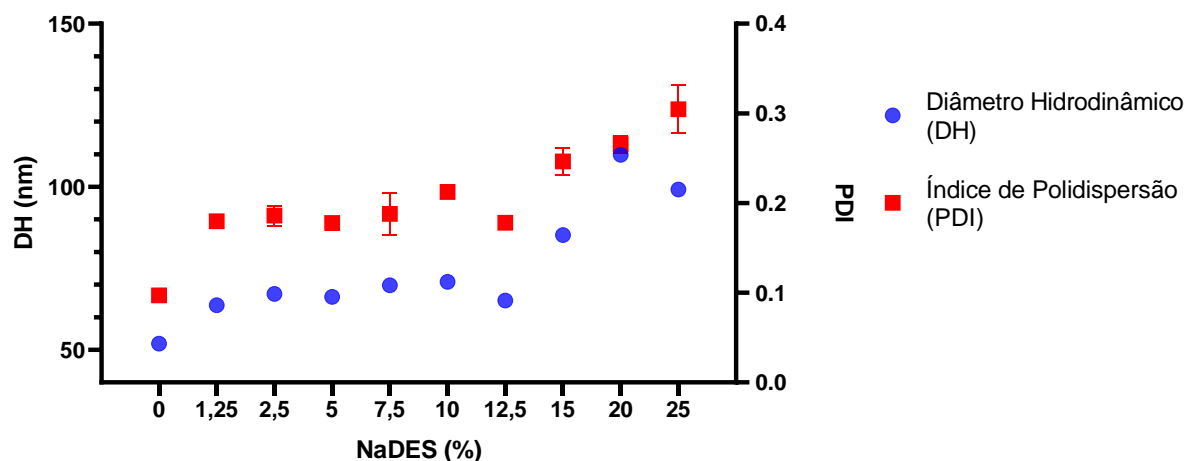
### **5. Resultados**

#### **5.1. Desenvolvimento das NLS**

O desenvolvimento das NLS contendo NaDES utilizou como base as formulações de NLS já estabelecidas por Mello, *et al.*, 2022<sup>101</sup>. Inicialmente, a fim de se compreender o comportamento da adição do solvente à formulação das nanopartículas, o NaDES foi adicionado em diferentes concentrações à formulação de NLS-Branca, e somente depois de selecionada a formulação com parâmetros coloidais mais adequados o solvente foi adicionado à NLS contendo o fotossensibilizador (NLS-AIPc).

Observa-se que a adição do solvente em baixas quantidades leva a um pequeno aumento no DH das partículas, que passam de 50 nm para aproximadamente 70 nm, assim como o seu PDI, que

passa de 0,100 para 0,180 (Figura 8). Entretanto, conforme se aumenta a quantidade do solvente, estes parâmetros coloidais se mantêm estáveis até a concentração de 12,5% do solvente (v:v), mostrando que não há alterações significativas na formulação. Já para concentrações mais altas do solvente (a partir de 15%), há um aumento expressivo no DH das partículas, que chegam a atingir mais que o dobro do seu tamanho original. O mesmo ocorre com o PDI, que atinge valores muito altos ( $> 0,2$ ), indicando que o aumento de NaDES na formulação de NLS em altas concentrações pode interferir na polidispersividade das partículas.



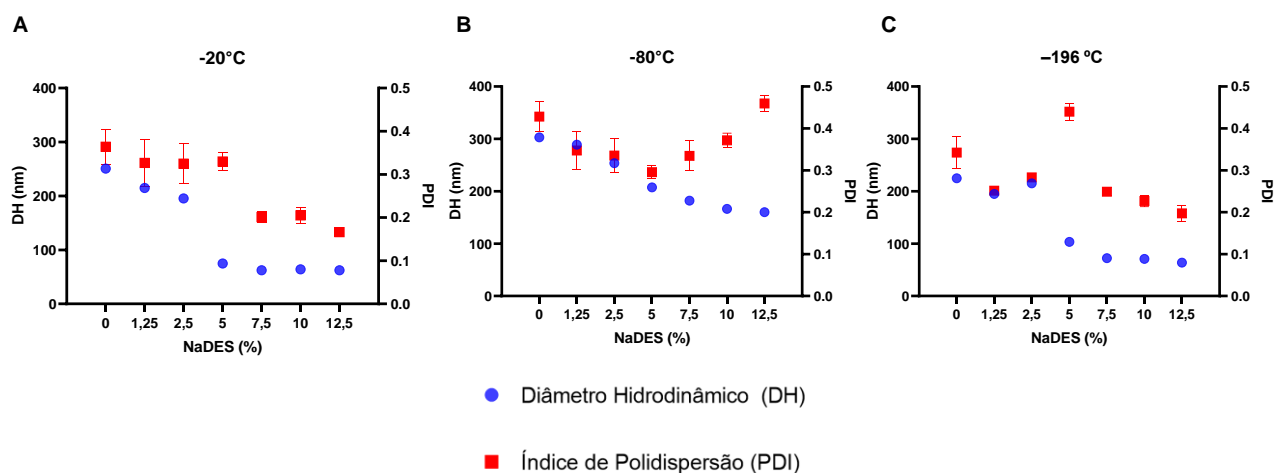
**Figura 8. Parâmetros coloidais de formulações de NLS-Branca e NLS-Branca-NaDES com diferentes concentrações do solvente.** O gráfico representa os parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersão (PDI) das formulações de NLS-Branca-NaDES. Foram feitas formulações contendo 0; 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10; 12,5; 15; 20 e 25% de solvente em sua composição. Para cada quantidade de solvente adicionada, a mesma quantidade de água foi retirada. Em 0% temos a formulação de nanopartículas sem nenhuma adição do solvente, sendo portanto, a NLS-Branca. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de triplicadas das formulações.

## 5.2. Congelamento das NLS

Considerando que uma das metodologias (liofilização) para concentrar as nanopartículas utilizadas no trabalho requer congelamento prévio e que o solvente verde utilizado nas formulações de NLS apresenta potencial em atuar como crioprotetor, testes de congelamento das NLS-Branca-NaDES em diferentes concentrações foram realizados visando avaliar este potencial crioprotetor do NaDES nas NLS, bem como a viabilidade de protocolos para a concentração das nanopartículas.

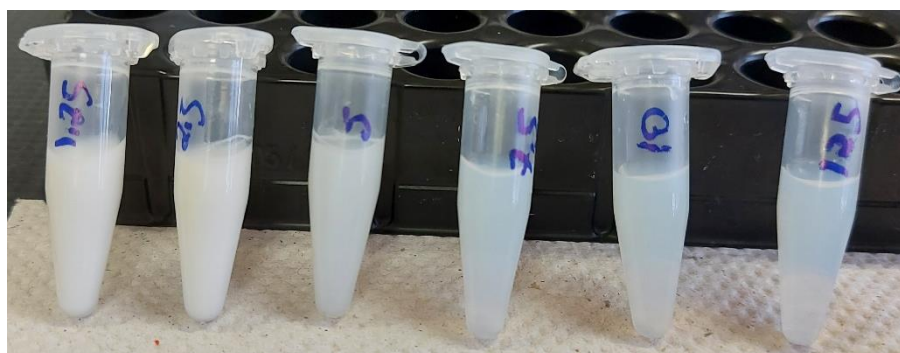
A NLS-Branca, que não continha nenhuma concentração do solvente em sua formulação, foi desestabilizada em todas as formas de congelamento analisadas, tendo seu DH atingido até 300 nm e seu PDI muito elevados, chegando a 0,4 após os procedimentos (Figura 9), enquanto as formulações de NLS que possuem maior concentração de solvente se comportaram melhor durante o congelamento (exceto para o congelamento a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), uma vez que seus parâmetros coloidais são pouco alterados, o

que não ocorre para as formulações com baixas concentrações de solvente, as quais são facilmente degradadas sob congelamento.



**Figura 9. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca e NLS-Branca-NaDES com diferentes concentrações do solvente após submetidas a diferentes congelamentos.** O gráfico representa os parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH) e índice de polidispersão (PDI) das formulações de NLS-Branca e NLS-Branca-NaDES submetidas a três tipos de congelamento: congelamento lento a  $-20^{\circ}\text{C}$  (A), congelamento rápido a  $-80^{\circ}\text{C}$  (B) e congelamento ultrarrápido com nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (C). Em 0% temos a formulação de nanopartículas sem nenhuma adição do solvente, sendo portanto, a NLS-Branca. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de triplicadas das formulações.

Dos três tipos de congelamento, os que se mostraram mais adequados para as NLS foram o congelamento lento a  $-20^{\circ}\text{C}$  (Figura 9.A) e o congelamento ultrarrápido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Figura 9.C), pois as partículas não sofreram aumentos significativos em seu DH e nem em seu PDI para as formulações com concentrações a partir de 7,5% do solvente. Tal fato pode ser observado também pela avaliação do aspecto visual das formulações, representado na Figura 10.



**Figura 10. Imagem das NLS-Branca-NaDES com diferentes concentrações de solventes após congelamento lento.** A imagem representa o aspecto visual das NLS-Branca-NaDES contendo 1,25; 2,5; 5; 7,5; 10 e 12,5% de NaDES em sua composição após o congelamento lento a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Observa-se que as NLS que apresentam menor concentração de NaDES apresentam aspecto mais turvo após o congelamento, o que indica uma aumento no DH das partículas, enquanto as NLS com maiores concentrações do solvente se mantêm translúcidas mesmo após serem congeladas.

Para o congelamento rápido a  $-80^{\circ}\text{C}$  (Figura 9.B) nenhuma das formulações resistiu à degradação, tendo seu DH e PDI aumentados expressivamente. O congelamento ultrarrápido com nitrogênio líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$  (Figura 9.C) apresentou comportamento semelhante ao congelamento lento. A formulação de NLS-Branca-NaDES com 12,5% do solvente se manteve estável tanto em congelamento lento quanto no congelamento ultrarrápido, entretanto, devido ao baixo custo e maior viabilidade, a metodologia de congelamento lento a  $-20^{\circ}\text{C}$  foi selecionada para dar seguimento aos demais protocolos que envolvem o congelamento das NLS.

Vale ressaltar que os testes de congelamento foram realizados com as formulações contendo até 12,5% de NaDES, visto que para as demais concentrações as NLS apresentaram parâmetros coloidais insatisfatórios mesmo antes do congelamento.

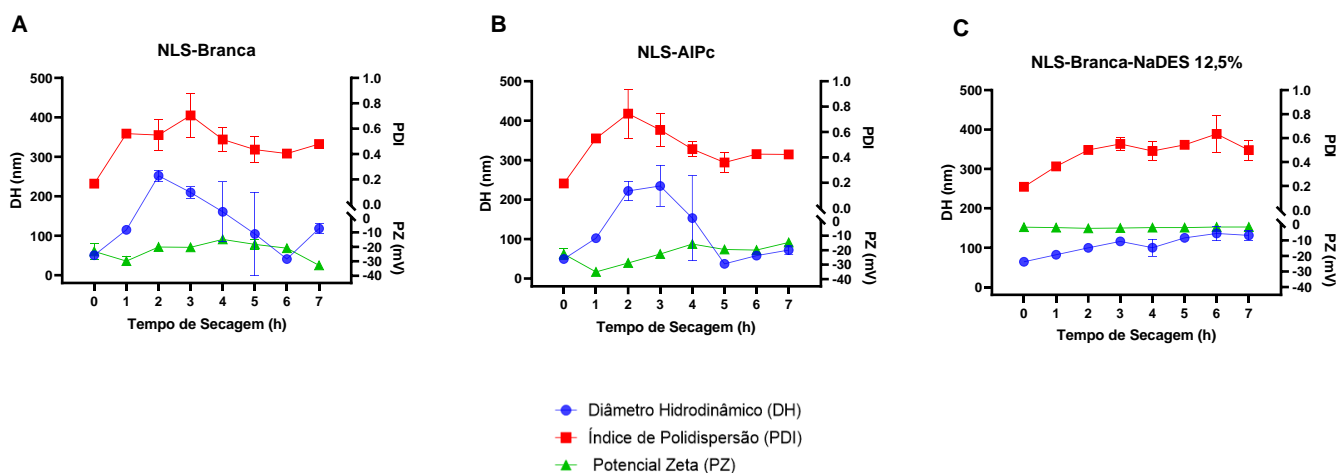
Diante do perfil coloidal apresentado, a formulação de NLS contendo 12,5% do solvente, por se apresentar como a formulação de maior incorporação do solvente mantendo os parâmetros coloidais foi selecionada para dar continuidade aos experimentos, assim como a metodologia de congelamento lento a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

### **5.3. Metodologias de Secagem das NLS**

#### ***5.3.1. Secagem por concentração a vácuo***

O procedimento de secagem por vácuo e centrifugação em Speed Vac levou ao aumento significativo no DH e PDI de todas as NLS analisadas, em especial nas três primeiras horas de secagem, quando é observado uma tendência crescente destes parâmetros. O mesmo ocorreu para o PZ, que sofreu flutuações ao longo de todo o período, apresentando, entretanto, desvios menores (Figura 11).

A cinética de estabilidade da NLS-Branca e NLS-AIPc durante o período de secagem apresentaram similaridade para todos os parâmetros analisados (DH, PDI e PZ) (Figura 11.A e Figura 11.B), o que se diferencia da formulação com NaDES. Tal semelhança pode ser dada pelo fato de que ambas possuem igual base lipídica, diferenciando-se apenas na incorporação do fotossensibilizante, o que implicaria na pequena diferença entre elas.

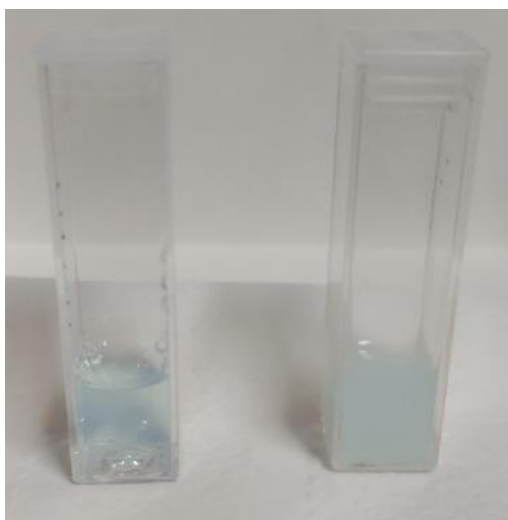


**Figura 11. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca, NLS-AIPc e NLS-Branca-NaDES 12,5% após secagem por vácuo e centrifugação em Speed Vac.** O gráfico representa os parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações de NLS-Branca (A), NLS-AIPc (B) e NLS-Branca-NaDES contendo 12,5% de solvente em sua formulação (C) após 7h de secagem por vácuo e centrifugação. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de triplicadas das formulações.

Apesar de apresentar também muitas alterações, destaca-se a diferença de comportamento da formulação de NLS-Branca-NaDES 12,5% em relação às demais, que apesar de apresentar aumento significativo em seus parâmetros coloidais, com DH atingindo 130 nm e PDI de 0,5, apresenta desvios padrões menores (Figura 11.C), demonstrando que a adição do solvente à formulação pode implicar em alterações que auxiliam na redução dos desvios, ainda que não implique na manutenção das propriedades coloidais.

Tal procedimento de secagem promoveu também alterações em aspectos observados visualmente nas NLS analisadas, conferindo-lhes aspecto turvo e mais oleoso, sendo, entretanto, menos intenso nas NLS formuladas com NaDES a 12,5%, o que corrobora com os resultados anteriormente apresentados sobre aumento de tamanho das NLS, que pôde ser observado também de forma macroscópica (Figura 12).

Mediante os resultados obtidos, a metodologia de secagem por vácuo e centrifugação não foi considerada adequada para concentrar as NLS e por isso não se procedeu com este ensaio para as NLS-AIPc-NaDES.

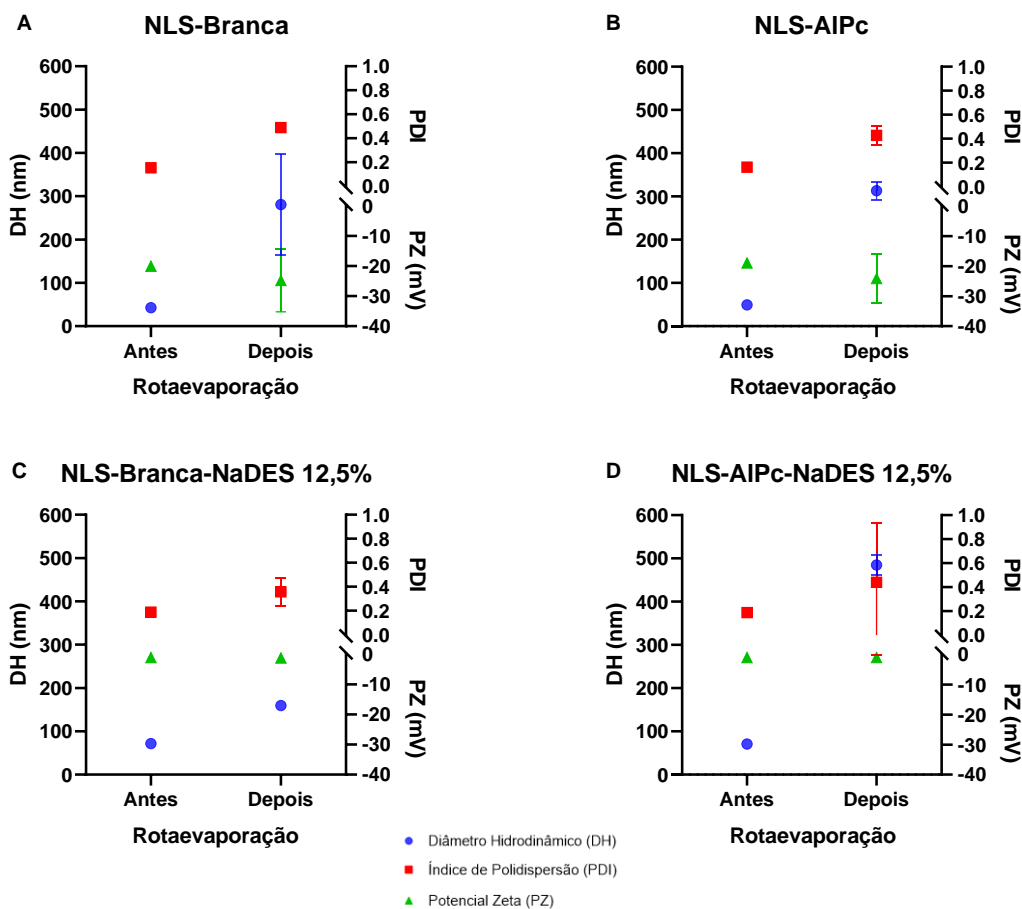


**Figura 12. Imagem da NLS-Branca NaDES (à esquerda) e NLS-Branca (à direita) após 1h de secagem sob vácuo e centrifugação em Speed Vac.** Observa-se que ainda no início da secagem, logo após 1h já é possível observar diferença nos aspectos visuais das nanopartículas. As NLS-Branca NaDES (à esquerda) mantiveram a sua característica macroscópica mais conservada em relação à NLS-Branca, a qual apresentou maior turbidez e sinais de degradação. A cor azulada das formulações deve-se ao efeito Tyndall.

### ***5.3.2. Secagem por rotaevaporação***

A secagem das NLS por rotaevaporação de solventes, assim como as demais metodologias, resultou em aumento no DH de todas as NLS (Figura 13), entretanto, nesta metodologia o DH atingiu valores maiores, chegando a próximo de 500 nm (Figura 13.D). Os valores de PDI apresentaram grande semelhança, de modo que após a rotaevaporação ficou próximo de 0,4 para todas as formulações. Conforme observado também nas demais metodologia de secagem, o PZ não foi alterado de forma considerável. O aumento no DH das partículas também pôde ser observado de forma macroscópica, como ilustra a Figura 14.

Não foram constatadas diferenças expressivas entre o comportamento das NLS contendo NaDES em relação às que não apresentam o solvente em sua formulação, de modo que todas sofreram aumento significativo após o procedimento de liofilização. Ademais, a rotaevaporação resultou também em amostras com maior desvio padrão, apresentando-se como uma metodologia de difícil reprodutibilidade e que promove a degradação das partículas, não sendo adequada para promover a concentração das mesmas.



**Figura 13. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES 12,5% e NLS-AIPc-NaDES 12,5% antes e depois da secagem por rotaevaporação.** O gráfico representa os parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações de NLS-Branca (A), NLS-AIPc (B), NLS-Branca-NaDES (C) e NLS-AIPc-NaDES (D) contendo 12,5% de solvente em sua formulação antes e depois do procedimento de secagem por 5h em rotaevaporação. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de triplicadas das formulações.



**Figura 14. Imagem da NLS-Branca-NaDES (A) e NLS-AIPc-NaDES (B) antes e após a secagem por rotaevaporação.** À esquerda a NLS-Branca-NaDES e à direita a NLS-AIPc-NaDES, antes e após a rotaevaporação, respectivamente. Observa-se o aspecto mais leitoso e turvo das amostras após o procedimento de secagem. Ressalta-se que as NLS

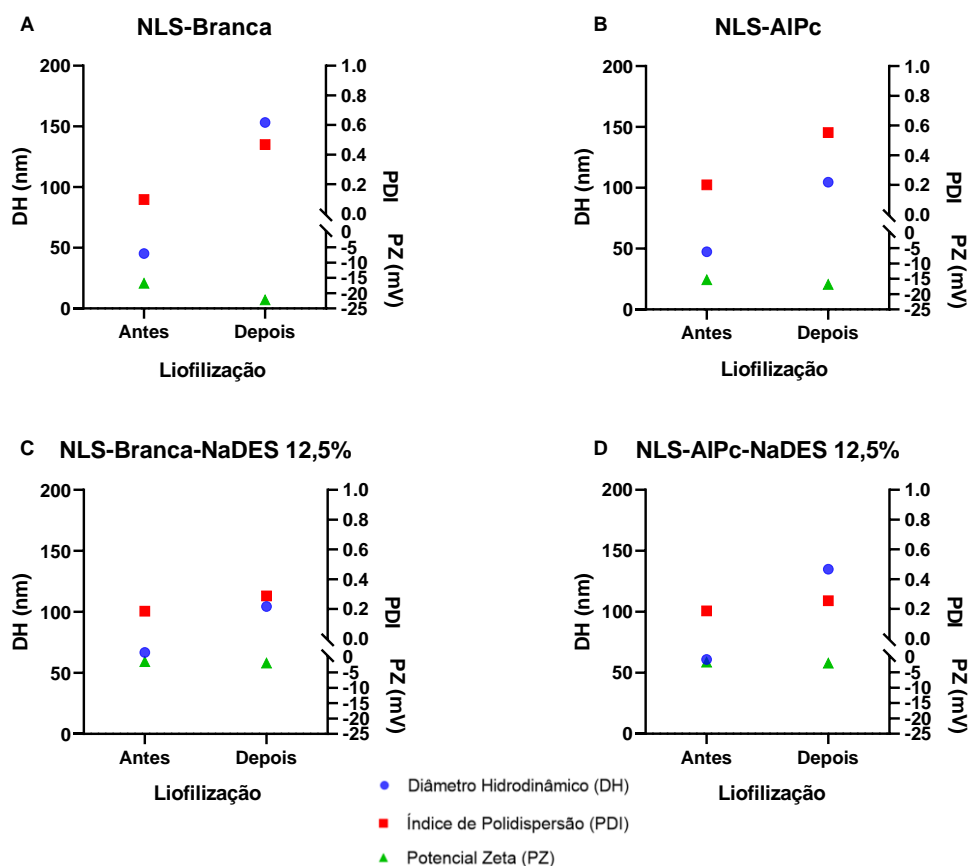
submetidas a rotaevaporação foram ressuspensas em seu volume original para avaliação e comparação de seus aspectos macroscópicos.

### ***5.3.3. Secagem por liofilização***

Utilizando como base os testes de congelamento previamente realizados, as NLS contendo 12,5% de NaDES (NLS-Branca-NaDES e NLS-AIPc-NaDES) congeladas a -20°C foram selecionadas para a secagem por liofilização, juntamente com as NLS-Branca e NLS-AIPc, visto que esta metodologia requer congelamento prévio das amostras.

Após o processo de secagem por liofilização foi observado aumento expressivo no DH de todas as NLS (Figura 15). Para as NLS que não possuem NaDES em sua formulação (Figura 15.A e Figura 15.B) o processo levou a um aumento de aproximadamente duas vezes no DH das partículas, assim como o PDI, que chegou a atingir aproximadamente 0,6. O PZ não foi alterado de forma expressiva (Tabela 4).

Para as formulações de NLS contendo NaDES (Figura 15.C e Figura 15.D), apesar de haver aumento no DH, ele é menos expressivo na NLS-Branca-NaDES. É importante ressaltar que para estas formulações o PDI se mantém praticamente inalterado, indicando que mesmo após a liofilização, embora as partículas tenham aumentado de tamanho, elas continuam dispersas, o que é bastante positivo considerando o estresse ao qual foram submetidas.



**Figura 15. Parâmetros coloidais das formulações de NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES 12,5% e NLS-AIPc-NaDES 12,5% antes e depois da secagem por liofilização.** O gráfico representa os parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das formulações de NLS-Branca (A), NLS-AIPc (B), NLS-Branca-NaDES (C) e NLS-AIPc-NaDES (D) contendo 12,5% de solvente em sua formulação antes e depois do procedimento de secagem por liofilização. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de triplicadas das formulações.

**Tabela 4. Parâmetros coloidais das NLS sem NaDES e das NLS contendo NaDES antes do processo de liofilização.**

ANTES DA LIOFILIZAÇÃO			
	DH (nm)	PDI	PZ (mV)
NLS-Branca	45,32 $\pm$ 0,411	0,096 $\pm$ 0,006	-16,73 $\pm$ 1,034
NLS-AIPc	47,48 $\pm$ 0,591	0,2 $\pm$ 0,012	-15,33 $\pm$ 0,377
NLS-Branca-NaDES 12,5%	66,77 $\pm$ 0,553	0,185 $\pm$ 0,01	-1,51 $\pm$ 0,131
NLS-AIPc-NaDES 12,5%	60,89 $\pm$ 0,038	0,186 $\pm$ 0,11	-1,69 $\pm$ 0,079

A tabela representa a média  $\pm$  SEM dos parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES 12,5% e NLS-AIPc-NaDES 12,5% antes do processo de liofilização.

O PZ das NLS contendo NaDES também se manteve bastante estável após o procedimento de secagem por liofilização (Tabela 5). No que diz respeito ao aspecto visual e macroscópico da formulação após a liofilização e ressuspensão, elas se mantiveram muito semelhantes aos da formulação não submetidas à liofilização, com aspecto translúcido e igual coloração (Figura 16), não apresentando indícios de degradação, mesmo tendo passado por distintos processos, o que indica potencial promissor para a metodologia de concentração utilizada.

Devido ao sucesso no procedimento de secagem das NLS por liofilização, apresentando-se como a única metodologia testada viável para a concentrar as NLS sem gerar alterações significativas em seus parâmetros coloidais, esta foi a metodologia utilizada para dar seguimento aos demais ensaios.

**Tabela 5. Parâmetros coloidais das NLS sem NaDES e das NLS contendo NaDES depois do processo de liofilização.**

DEPOIS DA LIOFILIZAÇÃO			
	DH (nm)	PDI	PZ (mV)
NLS-Branca	153,167±2,04	0,467±0,014	-22,2±0,455
NLS-AIPc	104,63±2,45	0,553±0,02	-16,83±0,33
NLS-Branca- NaDES 12,5%	104,43±1,239	0,287±0,945	-1,98±0,942
NLS-AIPc-NaDES 12,5%	134,9±0,432	0,255±0,014	-2,01±0,096

A tabela representa a média ± SEM dos parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) das NLS-Branca, NLS-AIPc, NLS-Branca-NaDES 12,5% e NLS-AIPc-NaDES 12,5% após o processo de liofilização.



**Figura 16. Imagem da NLS-AIPc-NaDES antes (à esquerda) e após a liofilização (à direita).** A NLS-AIPc-NaDES foi ressuspensa em seu volume original após o processo de liofilização, visando comparar os aspectos visuais da formulação

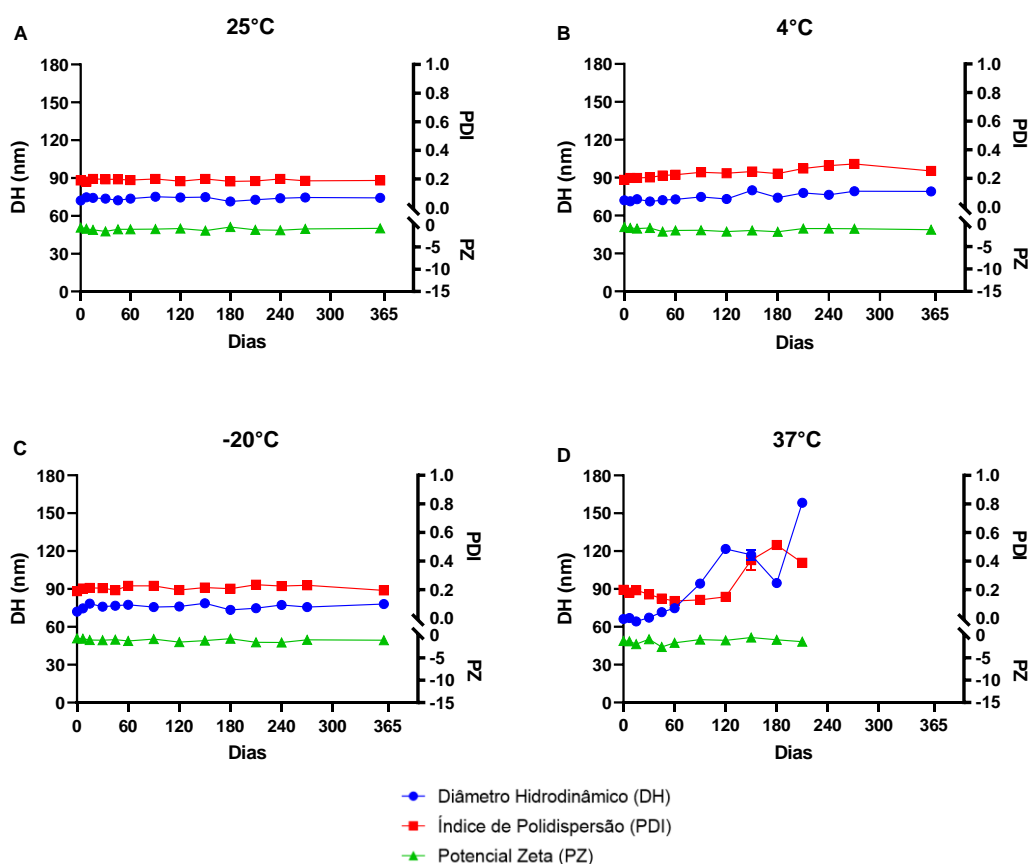
após o procedimento de secagem por liofilização. Observa-se que ambas as formulações apresentam aspectos macroscópicos muito semelhantes.

## 5.4. Caracterizações Físico-químicas

### 5.4.1. Estabilidade Coloidal

A estabilidade coloidal das NLS-Branca NaDES e NLS-AIPc-NaDES (não liofilizadas) foi analisada por um período de 365 dias sob quatro condições de armazenamento: temperatura ambiente (25°C), em geladeira (4°C), em estufa (37°C) e sob congelamento (-20°C). As análises de estabilidade em estufa duraram apenas 210 dias em decorrência da separação de fase das amostras. Análises de regressão linear simples foram realizadas para avaliar a significância estatística da estabilidade nas diferentes amostras. Os resultados obtidos encontram-se indicados na Figura 17 e Figura 18.

A NLS-Branca-NaDES apresentou-se estável em temperatura ambiente e em geladeira para os três parâmetros analisados (DH, PDI e PZ) ao longo de todo o período, não apresentando alterações significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 17.A e Figura 17.B).



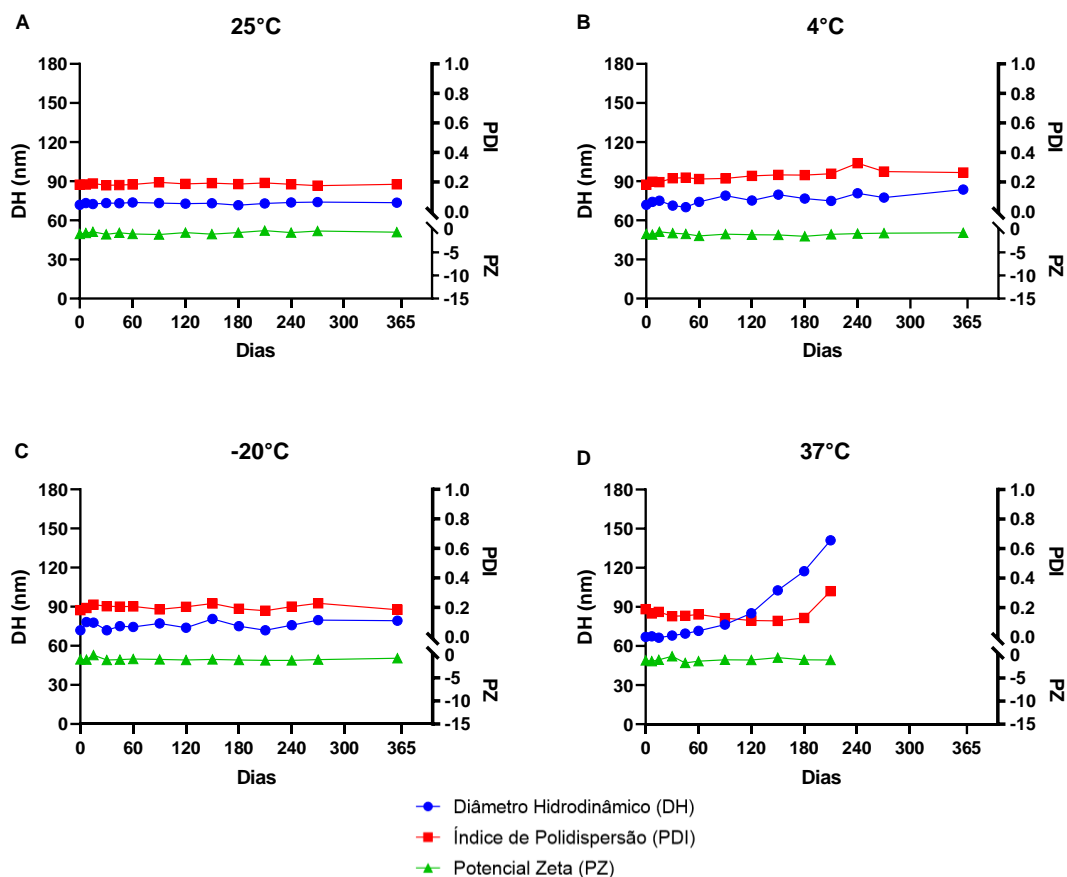
**Figura 17.** Estabilidade coloidal da NLS-Branca-NaDES durante 365 dias. O gráfico representa os parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) ao longo de 365 dias das

formulações de NLS-Branca-NaDES contendo 12,5% de solvente em sua formulação nas condições de (A) temperatura ambiente a 25°C, (B) resfriamento a 4°C, (C) congelamento a -20°C e (D) aquecimento a 37°C. Para a condição de aquecimento a amostra degradou antes de completar os 365 dias. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de triplicadas das formulações.

Dada a importância da condição de congelamento para o trabalho em questão, a mesma também foi avaliada a fim de se compreender melhor o comportamento das NLS. Para tal condição, a NLS-Branca-NaDES também apresentou estabilidade por 365 dias, não havendo alterações significativas em seus parâmetros (Figura 17.C).

Entretanto, em estufa a NLS-Branca-Nades manteve-se estável por apenas 60 dias, quando sofreu degradação com separação de fases, tal armazenamento implicou em alterações significativas em seu DH e PDI a partir de 90 dias, quando é possível perceber uma tendência de crescimento no DH (Figura 17.D). A instabilidade apresentada pode se justificar pela alta temperatura de armazenamento, promovendo a degradação da manteiga, cujo ponto de fusão é de 32,5°C<sup>103</sup>.

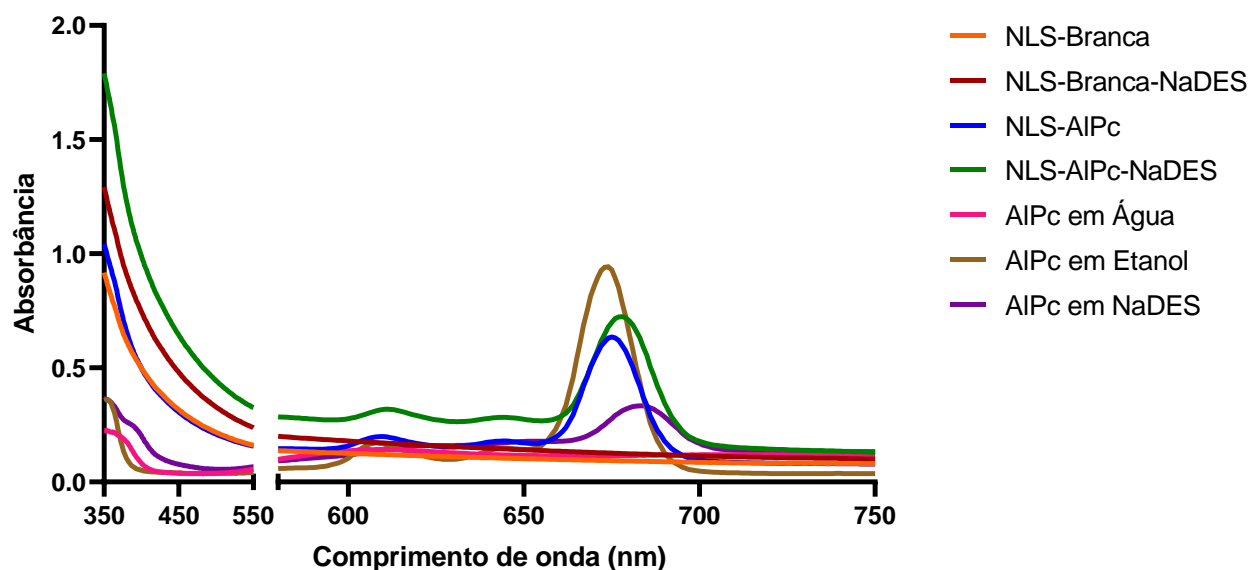
A NLS-AIPc-NaDES também se apresentou estável em temperatura ambiente e em geladeira ao longo de todo o período, tendo o mesmo ocorrido para a condição de congelamento, com valor de  $p > 0,05$  para todos os parâmetros (Figura 18.A, Figura 18.B e Figura 18.C), indicando que o tempo não levou a alterações significativas na estrutura da NLS. Já o seu armazenamento a 37°C levou à degradação das partículas, com aumentos expressivos em seu DH, em especial a partir de 90 dias (Figura 18.D).



**Figura 18. Estabilidade coloidal da NLS-AIPc-NaDES durante 365 dias.** O gráfico representa os parâmetros coloidais de diâmetro hidrodinâmico (DH), índice de polidispersão (PDI) e potencial zeta (PZ) ao longo de 365 dias das formulações de NLS-AIPc-NaDES contendo 12,5% de solvente em sua formulação nas condições de (A) temperatura ambiente a 25°C, (B) resfriamento a 4°C, (C) congelamento a -20°C e (D) aquecimento a 37°C. Para a condição de aquecimento a amostra degradou antes de completar os 365 dias. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de triplicadas das formulações.

#### 5.4.2. Espectroscopia de absorção e fluorescência

Para fins de compreensão a respeito do comportamento das NLS após a formulação com o NaDES, foram traçados os espectros de absorbância e fluorescência de todas NLS, bem como da AIPc nos diferentes meios. A Figura 19 ilustra o perfil de absorbância na região visível do espectro eletromagnético, compreendendo a faixa de 350 nm a 750 nm.



**Figura 19.** Espectro de absorvância de amostras de NLS sem NaDES e NLS com NaDES suspensas em solução aquosa, além da AIPc solubilizada em meio controle (água, etanol e NaDES). Todas as amostras apresentam concentração de 5 $\mu$ M, tendo como referência a AIPc.

Conforme o esperado, os resultados não indicam um pico específico de absorção na faixa analisada para as amostras brancas, que incluem a NLS-Branca e a NLS-Branca-NaDES. O que se observa, entretanto, é que em decorrência da turbidez das amostras, compostas por nanopartículas, há uma maior absorção na faixa inicial do espectro analisado, o que provavelmente se deve aos compostos lipídicos ali presentes, já que para as demais amostras o mesmo não é observado.

A AIPc em água também não apresenta pico de absorção característico, o que ocorre devido ao fato de que o fármaco não se solubiliza em meio aquoso, fazendo com que leve à formação de agregados que não absorvem a luz.

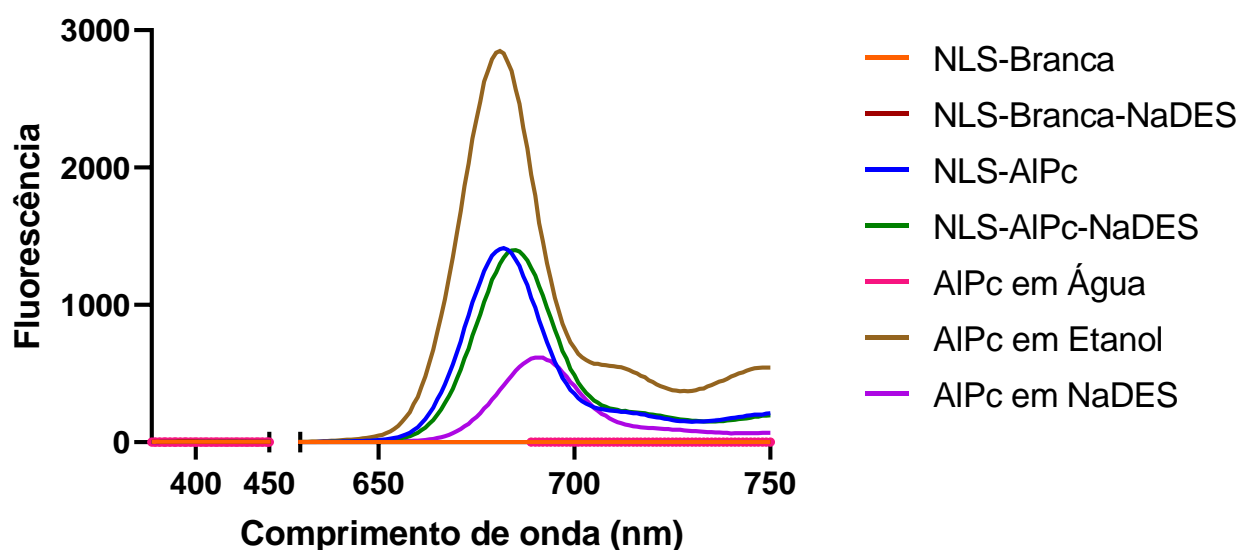
O espectro da AIPc solubilizada em etanol apresenta dois picos característicos esperados, um em 608 nm e outro em 673 nm, além de apresentar a maior intensidade em relação aos demais espectros, uma vez que está em um meio cuja solubilização ocorre com facilidade.

No que diz respeito à NLS-AIPc e NLS-AIPc-NaDES, é notável que ambas apresentam espectro semelhante em faixa de absorção (674 nm e 678 nm, respectivamente) e em intensidade de absorção, que apesar de ser menor do que AIPc em etanol, ainda é bastante considerável, tendo em vista sua formulação à base de água.

Visando compreender também o comportamento da AIPc no solvente em estudo, o espectro de AIPc em NaDES foi traçado na mesma concentração das demais soluções. Destaca-se um pequeno pico de absorvância na faixa de 680 nm, bem próximo à faixa de absorção da AIPc em etanol. Apesar

de apresentar baixa intensidade, ela ainda existe, podendo indicar uma eventual solubilização da AIPc pelo NaDES.

Visando analisar também o comportamento espectral de fluorescência das amostras mediante excitação, foi traçado o espectro de fluorescência com excitação em 350 nm e emissão de 360 nm a 750 nm, conforme ilustra a Figura 20.



**Figura 20.** Espectro de fluorescência (excitação em 350 nm) de amostras de NLS sem NaDES e NLS com NaDES suspensas em solução aquosa, além da AIPc solubilizada em meio controle (água, etanol e NaDES). Todas as amostras apresentam concentração de 5  $\mu$ M, tendo como referência a AIPc.

Não houve emissão de fluorescência pelas NLS-Branca, NLS-Branca-NaDES e nem pela AIPc em Água, com os espectros se mantendo em linha basal. Os espectros das NLS-AIPc e NLS-AIPc-NaDES apresentaram picos de emissão, em 682 nm e 654 nm, respectivamente, estando muito próximos e com igual intensidade, o que pode indicar que a adição do solvente à formulação não implicou em alteração na fluorescência da NLS, conseqüentemente, não interferindo na quantificação do fármaco.

Alta intensidade de fluorescência foi apresentada pela AIPc em etanol, com pico em torno de 680 nm, característico da AIPc e adequado para uso em TFD. A AIPc em NaDES, apesar de baixa intensidade, apresentou emissão por volta de 690 nm, o que representa um deslocamento batocrômico (para a região do vermelho) em relação à AIPc em etanol, o que pode não ter ocorrido para a NLS-AIPc-NaDES em virtude da melhor solubilização da AIPc na nanoestrutura.

### 5.4.3. Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)

Buscando avaliar eventuais modificações que (i) a incorporação do NaDES e os (ii) processos de liofilização e (iii) ressuspensão tenham induzido nos nanossistemas resultantes (sem e com AlPc), as formulações foram analisadas utilizando-se a técnica de FTIR. As Figura 21, Figura 22 e Figura 23 ilustram os espectros obtidos e fornecem suporte para responder os pontos mencionados.

Para responder o primeiro ponto (i), foi previamente analisado o perfil espectral do NaDES (Figura 21), juntamente com os constituintes envolvidos em sua formulação (glicerol ( $C_3H_8O_3$ ), ácido cítrico ( $C_6H_8O_7$ ), e cloreto de colina ( $C_5H_{14}ClNO$ ). Observa-se uma composição complexa e as linhas tracejadas (1 a 12) representam os picos compartilhados entre o NaDES e seus constituintes. Os picos encontrados estão em consonância com a literatura <sup>98</sup>.

A banda alargada, situada em  $3321\text{ cm}^{-1}$  (1) está relacionada ao grupamento  $\nu(OH)$ , enquanto os picos estreitos em  $2934\text{ cm}^{-1}$  (2) e  $2890\text{ cm}^{-1}$  (3) referem-se, respectivamente, aos grupamentos  $\nu_{as}(CH_2)$  e  $\nu_s(CH_2)$ . As assinaturas em  $1721\text{ cm}^{-1}$  (4) e  $1646\text{ cm}^{-1}$  (5) podem estar correlacionadas ao  $\nu(C=O)$ . Na região do fingerprint ( $1500-500\text{ cm}^{-1}$ ), o pico forte e estreito, situado em  $1035\text{ cm}^{-1}$  (10) pode estar relacionado ao  $\nu_{as}(C-C-O)$ , com indicativo correspondente tanto ao glicerol, quanto ao cloreto de colina. Os picos adicionais, médios e fracos, situados em  $1411$  (6),  $1331$  (7),  $1205$  (8),  $1107$  (9),  $991$  (11) e  $860\text{ cm}^{-1}$  (12) podem ser atribuídos, nesta ordem, à  $\delta(C-O-H)$ ,  $\rho(C-O-H)$ ,  $\nu(C-C-O)$ ,  $\delta(OH)$ ,  $\delta(OH)$ ,  $\nu_s(C-C-O)$ .

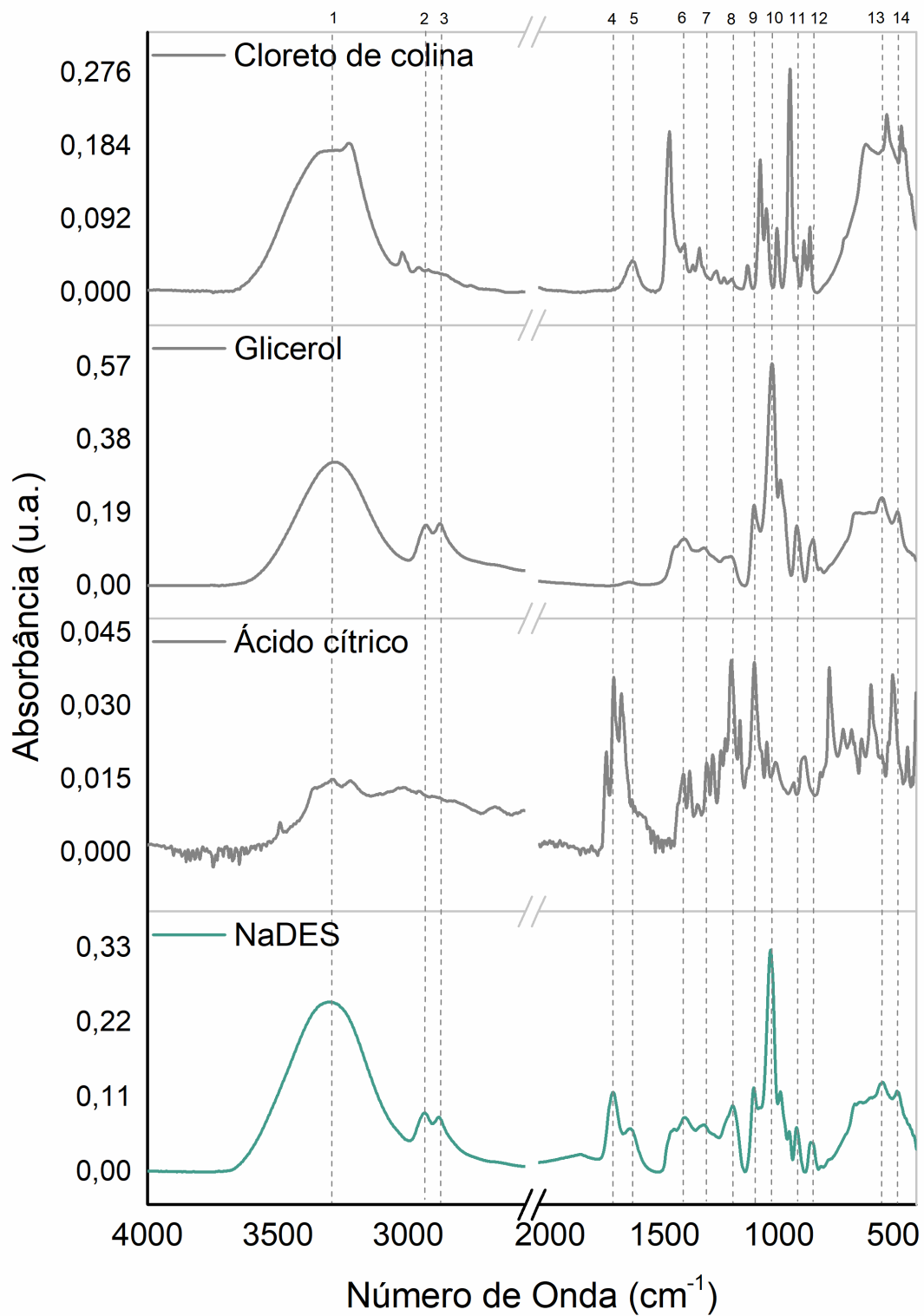


Figura 21. Espectro de absorção do infravermelho por transformada de Fourier para os componentes do NaDES isoladamente (Cloreto de Colina, Glicerol e Ácido Cítrico) e para o solvente (NaDES) já formulado.

Ao comparar os perfis espectrais resultantes das formulações sem o ativo, nomeadas NLS-Branças (Figura 22), nota-se a presença significativa do perfil lipídico apresentado por todas as NLS, expresso pela manteiga de Murumuru, nas bandas correspondentes a  $2921\text{ cm}^{-1}$  (2),  $2850\text{ cm}^{-1}$  (3) e  $1741\text{ cm}^{-1}$  (4), e pelo Brij® O10, posto que este tensoativo é proveniente de éteres graxos de origem vegetal. Observa-se, também, que a incorporação do solvente à formulação gera alterações espectrais expressivas em relação às absorbâncias/intensidades relativas na região da banda do OH ( $3321\text{ cm}^{-1}$  (1)) para os nanossistemas contendo NaDES; diferenciando-se também por apresentarem o pico referente ao  $\nu_{\text{as}}(\text{C-C-O})$  (10), situado em  $1035\text{ cm}^{-1}$ , característico do NaDES.

Para responder o segundo ponto (ii), referente ao processo de liofilização, são comparadas as NLS-Branca-NaDES e NLS-Branca-NaDES-Liof. O perfil espectral do nanossistema, posteriormente à liofilização, sofre alterações relevantes, dadas pela ausência de água na amostra, induzindo variações nas ligações/grupamentos químicos observados; sendo bastante distintos em relação ao estágio anterior (NLS-Branca-NaDES), na região compreendida entre  $1830$  e  $400\text{ cm}^{-1}$ . Entretanto, ao serem ressuspendidas em meio aquoso, terceiro ponto (iii) mencionado, a formulação adquire um perfil espectral similar aos das NLS não submetidas ao processo de liofilização (NLS-Branca-NaDES), conforme verificado na amostra NLS-Branca-NaDES-Liof-Res (liofilizada e ressuspendida).

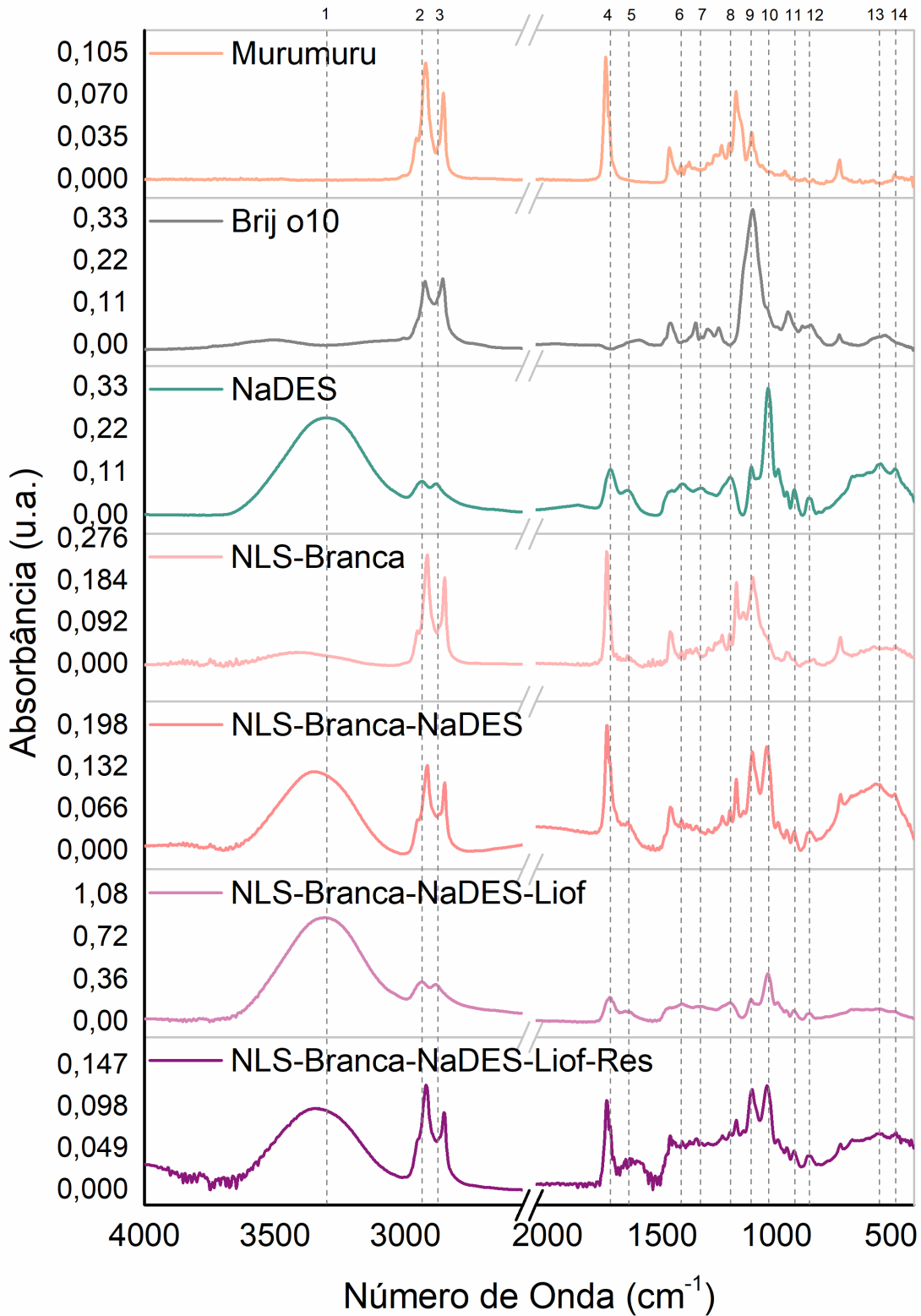


Figura 22. Espectro de absorção do infravermelho por transformada de Fourier para todas as amostras de NLS brancas (sem fármaco), bem como para os componentes que as integram: Murumuru, Brij O10, NaDES, NLS-Branca, NLS-Branca-NaDES, NLS-Branca-NaDES-Liof e NLS-Branca-NaDES-Liof-Res.

Para a NLS contendo o ativo AIPc e sem a presença do NaDES (NLS-AIPc, Figura 23), é observado um comportamento similar ao previamente descrito, onde a formulação apresenta o mesmo perfil espectral da NLS-Branca, sendo definido pela parte lipídica. Adicionalmente, sem apresentar alterações notáveis dadas pela adição da AIPc. Já para NLS-AIPc-NaDES, a incorporação do solvente (ponto (i)) provoca alterações nas ligações/grupamentos químicos, revelando um espectro análogo ao NaDES, indicando que a presença da AIPc contribui com esta modificação, posto que é a única distinção entre as formulações Brancas e aquelas contendo AIPc; notavelmente nas bandas/picos situados em  $3321\text{ cm}^{-1}$  (1),  $2921\text{ cm}^{-1}$  (2),  $2850\text{ cm}^{-1}$  (3),  $1741\text{ cm}^{-1}$  (4) e  $1035\text{ cm}^{-1}$ .

Relacionado ao processo de liofilização, ponto (ii), ao comparar os espectros das NLS-AIPc-NaDES e NLS-AIPc-NaDES-Liof, observa-se comportamento similar ao que ocorre para as NLS Brancas, onde a retirada de água da formulação induz alterações no perfil espectral, mas a sua reinserção (ponto (iii)), representada no espectro NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res (liofilizada e ressuspendida), resulta no rearranjo das ligações/grupamentos, resultando em um perfil espectral misto, com picos característicos tanto do NaDES quanto da parte lipídica, com destaque para os grupamentos  $\nu_s(\text{CH}_2)$  (2) e  $\nu_s(\text{CH}_2)$  (3),  $\nu(\text{C}=\text{O})$  (4) e  $\delta(\text{OH})$  (9).

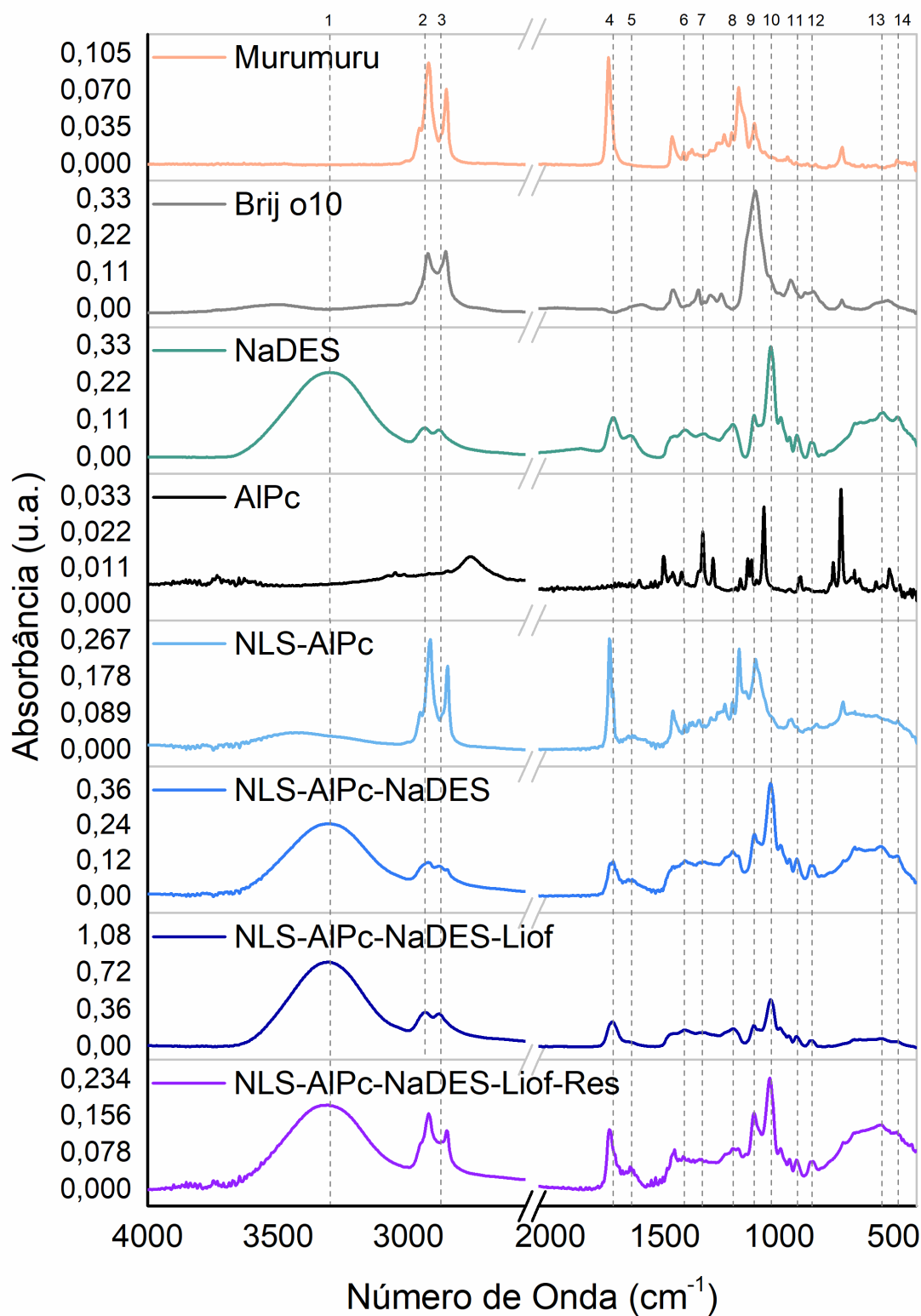


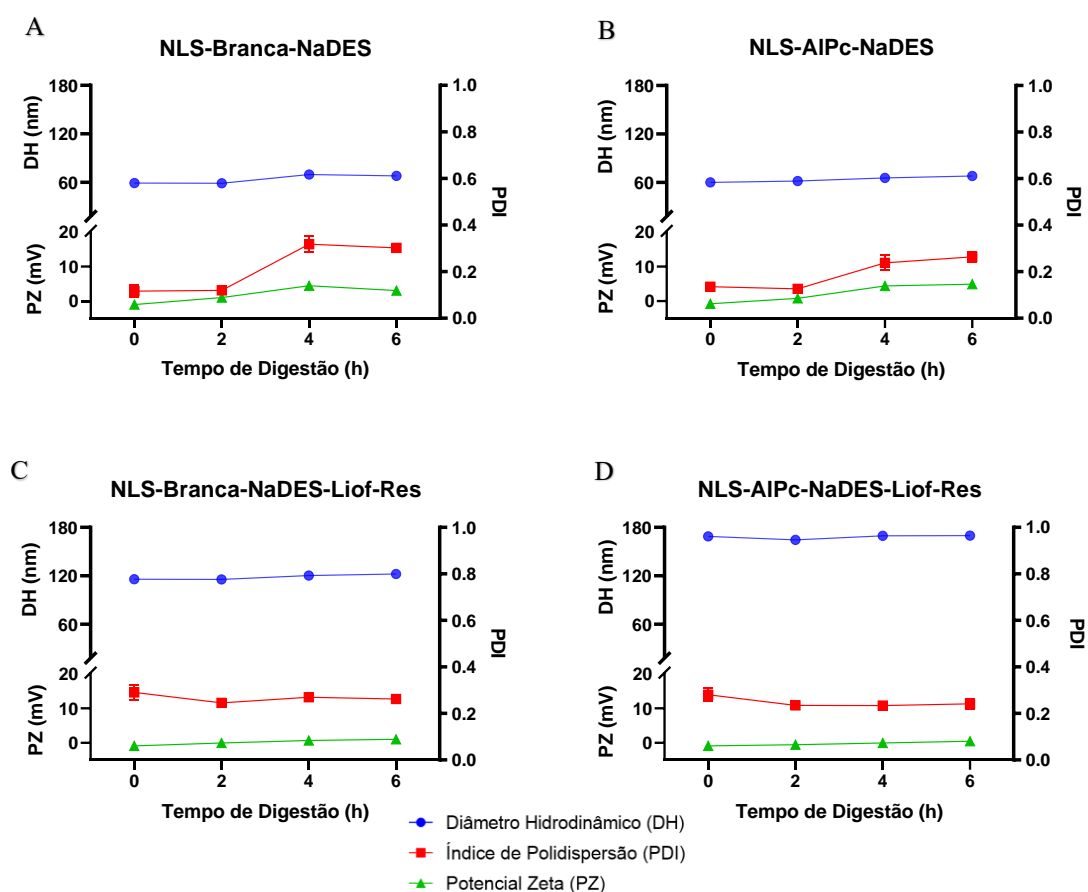
Figura 23. Espectro de absorção do infravermelho por transformada de Fourier para todas as amostras de NLS contendo AIPc, bem como para os componentes que as integram: Murumuru, Brij O10, NaDES, AIPc, NLS-AIPc, NLS-AIPc-NaDES, NLS-AIPc-NaDES-Liof e NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res.

#### 5.4.4. Estabilidade em fluido gastrointestinal simulado

Diante do interesse em tornar as NLS desenvolvidas no trabalho plataformas para a administração oral visando o tratamento de melanoma, foram realizados ensaios com fluido gastrointestinal simulado, de modo que possa se compreender melhor como as NLS se comportam tanto no fluido estomacal, quanto intestinal, de forma dinâmica.

Para o ensaio foram utilizadas as NLS contendo NaDES em sua formulação (NLS-Branca-NaDES e NLS-AIPc-NaDES) além das NLS contendo NaDES e submetidas ao processo de liofilização (NLS-Branca-NaDES-Liof-Res e NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res), as quais foram ressuspendidas com um volume três vezes menor de água, fazendo com que sua concentração aumentasse em três vezes.

É importante ressaltar que as leituras foram realizadas nos tempos de 0h (NLS antes de serem submetidas aos fluidos), após 2h em FGS, após 2h em FIS (totalizando 4h de digestão), e após 4h em FIS (totalizando 6h de digestão). Os resultados estão expressos na Figura 24.



**Figura 24. Estabilidade coloidal em fluido gastrointestinal simulado ao longo de 6h de digestão.** Em (A) NLS-Branca-NaDES, em (B) NLS-AIPc-NaDES, em (C) NLS-Branca-NaDES-Liof-Res e em (D) NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res. O tempo de 0h representa as NLS antes da submissão aos fluidos gastrointestinais. O tempo de 2h representa as NLS em FGS e os tempos de 4h e 6h representam as NLS em FIS. Os dados representam a média  $\pm$  SEM de três leituras diferentes.

As NLS não liofilizadas (Figura 24.A e Figura 24.B) apresentaram perfil muito semelhante ao longo de todo o ensaio, com o DH se mantendo bem estável e sem alterações significativas. Já o PDI dobrou de valor, perceptível após 4h de digestão, quando FGS foi adicionado ao FIS. Para estas amostras, o PZ apresentou também um pequeno aumento, passando a adquirir carga positiva.

As NLS liofilizadas e ressuspendidas (Figura 24.C e Figura 24.D), apesar de apresentarem parâmetros coloidais iniciais mais elevados em decorrência da liofilização, permaneceram bastante estáveis ao longo de todo o ensaio, não apresentando alterações significativas para nenhum dos parâmetros analisados, o que pode ser observado pelas linhas traçadas no gráfico.

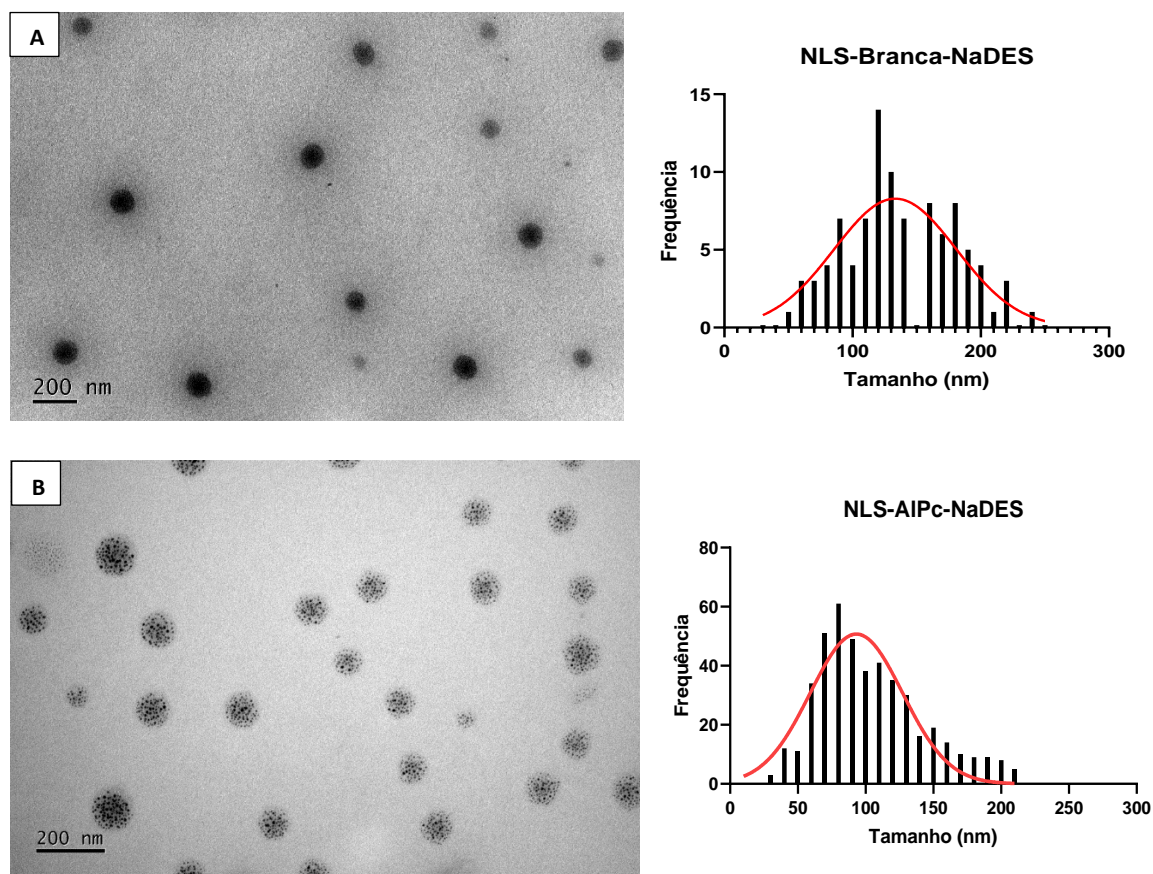
De maneira geral, as NLS submetidas à liofilização comportam-se melhor mediante as alterações do fluido gastrointestinal simulado, visto que passam por todo o processo sem grandes alterações em seu tamanho e polidispersão e carga de superfície, o que demonstra o potencial da metodologia para tornar-se uma plataforma para administração oral.

## **5.5. Caracterização Morfológica das NLS**

### ***5.5.1. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)***

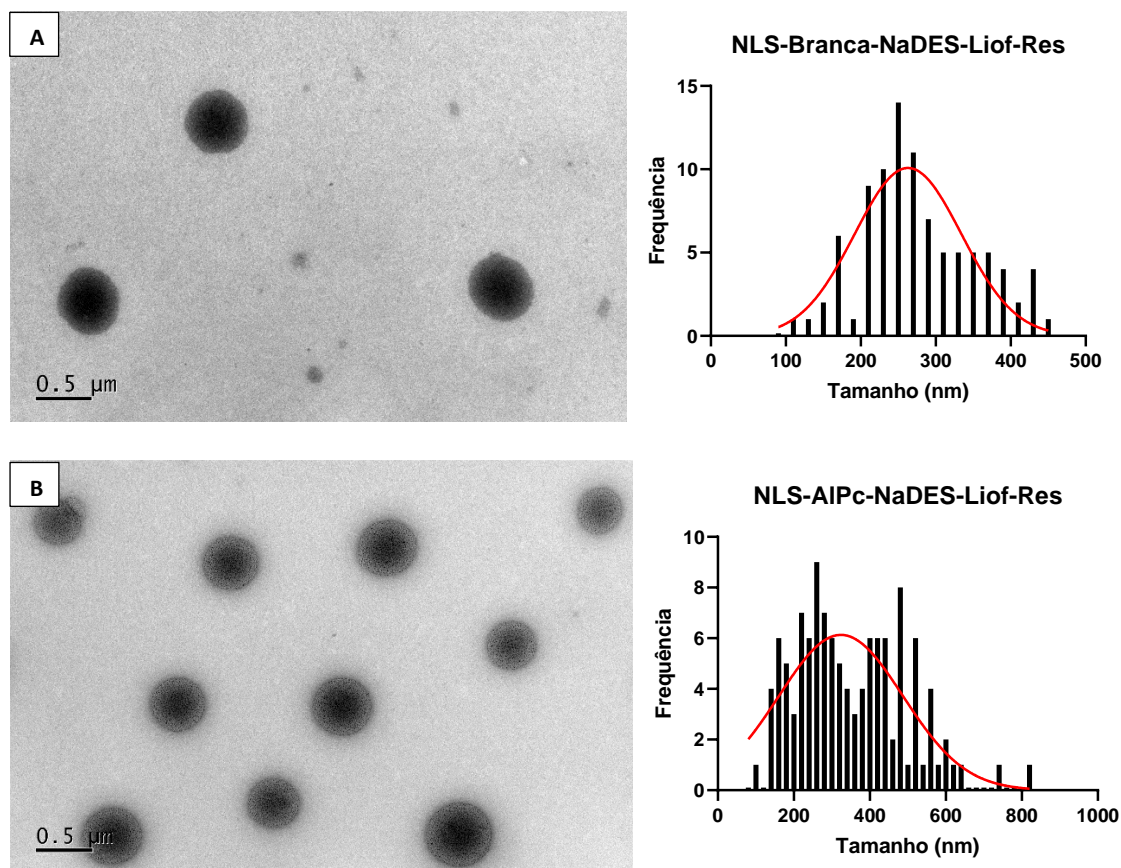
A fim de se avaliar a estrutura das NLS antes e após o procedimento de liofilização, foram feitas imagens por microscopia eletrônica de transmissão (MET) das NLS-Branca-NaDES, NLS-AIPc-NaDES (Figura 25), NLS-Branca-NaDES-Liof-Res e NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res (Figura 26).

As NLS não submetidas à liofilização apresentam estruturas de forma esferoidal e bastante monodispersas, com a NLS-Branca-NaDES apresentando tamanho médio de 133 nanômetros e núcleo mais eletrodense (Figura 25.A). Já as NLS-AIPc-NaDES apresentam partículas com tamanho médio de 93 nm e pequenas regiões mais densas intercaladas por regiões menos densas, reflexo da incorporação de AIPc à nanopartícula (Figura 25.B).



**Figura 25.** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão com magnificação de 10.000 vezes da NLS-Branca-NaDES (A) e da NLS-AIPc-NaDES (B), com seus respectivos histogramas de distribuição do tamanho.

Após submetidas à liofilização, observa-se que o formato esferoidal das nanopartículas se mantém, assim como o perfil de eletrodensidade, indicando que a metodologia de concentração não implicou em demasiadas alterações estruturais. Entretanto, devido ao processo de liofilização, as partículas apresentam maior polidispersão. A NLS-Branca-NaDES-Liof-Res apresentaram partículas com tamanho médio de 263 nm (Figura 26) ao passo que as e NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res apresentaram partículas com tamanho médio de 323 nm.



**Figura 26.** Imagem de microscopia eletrônica de transmissão com magnificação de 5.000 vezes da NLS-Branca-NaDES-Liof-Res (A) e da NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res (B) com seus respectivos histogramas de distribuição do tamanho.

### 5.5.2. *Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)*

A Figura 27 ilustra as imagens por varredura eletrônica das NLS liofilizadas e ressuspensas. Conforme observado por MET, em MEV as NLS também apresentam formato esferoidal, além de superfícies lisas, entretanto, devido ao processo de liofilização, as partículas adquirem tamanhos maiores e mais variados, refletindo em sua polidispersão, que passa a ser maior também.

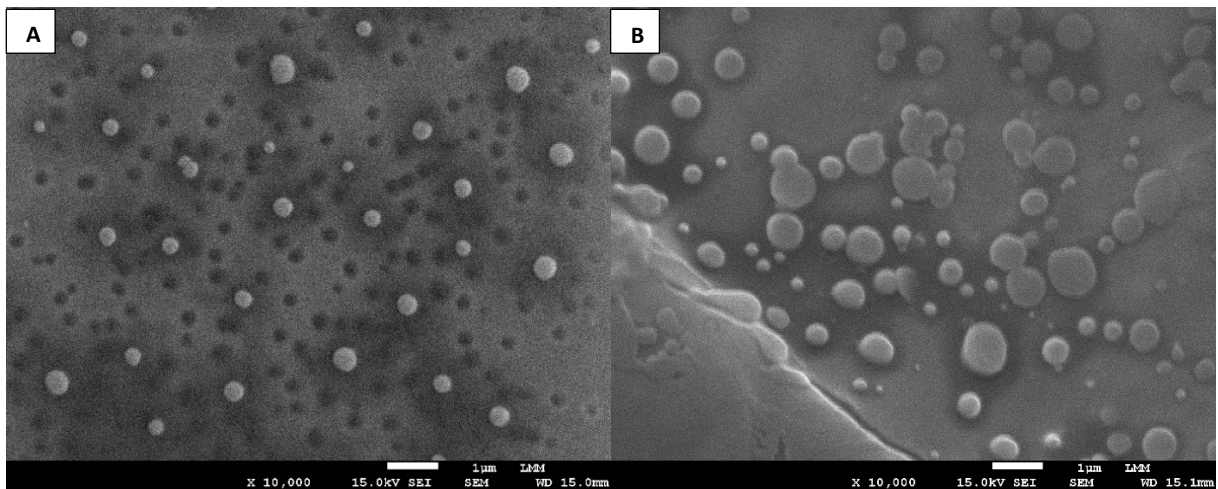


Figura 27. Imagem de microscopia eletrônica de varredura com magnificação de 10.000 vezes da NLS-Branca-NaDES-Liof-Res (A) e da NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res (B).

## 5.6. Ensaio Biológicos *in vitro*

### 5.6.1. Ensaio de viabilidade celular

A fim de se avaliar a toxicidade das NLS para células de melanoma murino, foram realizados ensaios de viabilidade celular por MTT em células da linhagem B16-F10 com as NLS desenvolvidas no trabalho, conforme representado na Figura 28.

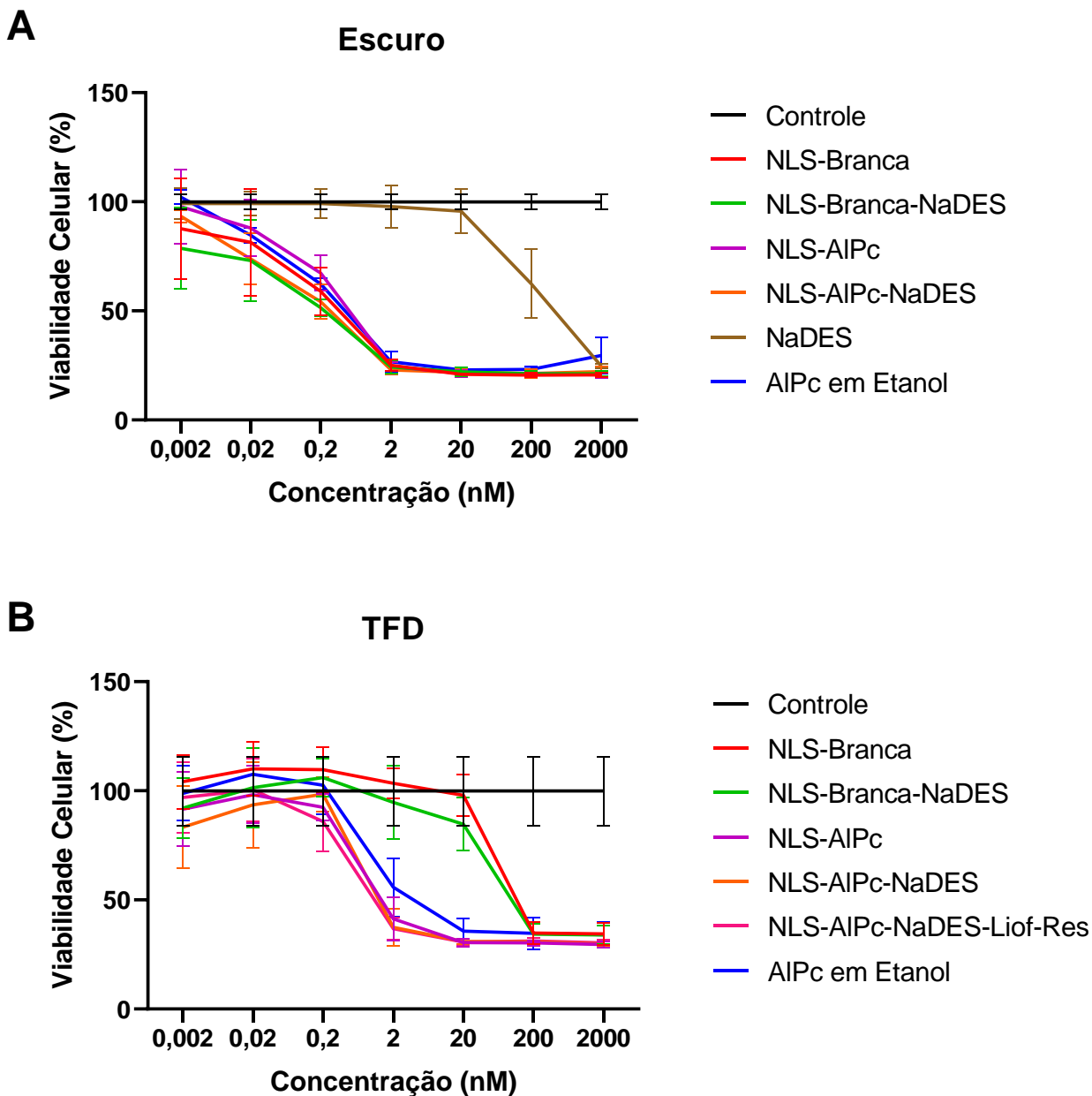


Figura 28. Análise da toxicidade das NLS mediante ensaio de viabilidade celular por MTT de células B16-F10 24h após o tratamento no escuro, sem irradiação (A) e com irradiação por TDF (B). O gráfico representa a curva de viabilidade celular em percentual após tratamento nas concentrações de indicadas, as quais se referem à AIPc. Os dados representam a média  $\pm$  SEM da porcentagem de viabilidade celular de três experimentos independentes em quadruplicada.

Para avaliar os efeitos na TFD, os ensaios foram realizados no escuro (Figura 28.A) e com irradiação (Figura 28.B) e as células foram tratadas com as NLS nas concentrações de 0,002; 0,02; 0,2; 2; 20; 200 e 2000 nM. Para ambos os ensaios foram analisados os seguintes grupos: Controle (sem tratamento), NLS-Branca, NLS-Branca-NaDES, NLS-AIPc, NLS-AIPc-NaDES e AIPc em Etanol. O grupo NaDES foi avaliado apenas no ensaio sem irradiação, pois o objetivo era somente avaliar o seu

efeito de toxicidade isoladamente, enquanto o grupo da NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res foi avaliado apenas sob irradiação por TFD, visto que o interesse maior deste grupo se dá sob o efeito da TFD.

Os resultados indicam que o tratamento apresenta característica de dose-dependência, visto que conforme sua concentração aumenta, a viabilidade é reduzida. O IC<sub>50</sub> se apresenta por volta de 2 nM para a maioria dos tratamentos (Tabela 6

Tabela 7), exceto para o NaDES isoladamente, o qual apresentou toxicidade apenas em concentrações muito altas, o que indica que o solvente de forma isolada não é tóxico, mas as nanopartículas sim.

**Tabela 6. Valores de IC<sub>50</sub> para células B16-F10 tratadas após 24h (escuro).**

<b>Tratamento</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>
NLS-Branca	2,4
NLS-Branca-NaDES	2,0
NLS-AIPc	2,6
NLS-AIPc-NaDES	1,1
NaDES	201,3
AIPc em Etanol	1,5

**Tabela 7. Valores de IC<sub>50</sub> para células B16-F10 tratadas após 24h (TFD).**

<b>Tratamento</b>	<b>IC<sub>50</sub> (nM)</b>
NLS-Branca	36,4
NLS-Branca-NaDES	31,5
NLS-AIPc	0,8
NLS-AIPc-NaDES	1,2
NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res	0,4
AIPc em Etanol	1,1

No ensaio de viabilidade sem irradiação observa-se que todas as NLS apresentam toxicidade muito semelhante entre si, incluído as NLS sem o fármaco, o que não é observado no tratamento com TFD, onde as NLS-Branca e NLS-Branca-NaDES não apresenta redução significativa da viabilidade, chegando a promover a proliferação celular.

Buscando compreender se a adição do solvente à formulação das NLS juntamente com a metodologia de concentração utilizada interfere na toxicidade celular das nanopartículas, analisou-se

o perfil de toxicidade das NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res mediante TFD, sendo possível perceber que os procedimentos utilizados inferiram em aumento do perfil de toxicidade celular deste tratamento, visto que a NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res apresentou-se mais tóxica do que a NLS-AIPc-NaDES.

## 6. Discussão

O melanoma é um tipo de câncer de pele que tem origem nos melanócitos e em geral se apresenta de forma bastante agressiva e com alto potencial metastático. Apesar dos esforços, os tratamentos até então aplicados na clínica não levam a resultados satisfatórios, visto que a taxa de reincidência e mortalidade em decorrência do melanoma ainda são muito altas<sup>104-106</sup>. Portanto, fica evidente a necessidade da busca pelo desenvolvimento de novas tecnologias terapêuticas que resolvam essa problemática e atuem com eficácia no tratamento deste câncer.

Neste contexto, uma alternativa terapêutica emergente é o uso de fotossensibilizantes de terceira geração para aplicação em terapia fotodinâmica. Recentemente, nosso grupo de pesquisa desenvolveu uma NLS carreadora do fotossensibilizante AIPc, que demonstrou alta fotocitotoxicidade *in vitro* contra células de melanoma murino<sup>101</sup>, entretanto em experimentos piloto com camundongos C57BL/6 observou-se baixa entrega deste fármaco na região tumoral por via de administração oral. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi desenvolver uma plataforma para administração oral contendo fotossensibilizante de terceira geração em sua forma concentrada e associada a solvente verde para o tratamento de melanoma murino. A pesquisa resultou na primeira formulação de nanopartículas lipídicas sólidas associada a NaDES até então descrita, com potencial para se tornar uma plataforma de administração oral para o tratamento de melanoma.

A escolha de um NaDES para o desenvolvimento das NLS ocorreu devido ao seu potencial de agregar valor à formulação de nanopartículas. Apesar de já haver descrições prévias da utilização de NaDES associada à síntese de nanopartículas, especialmente as metálicas<sup>107-109</sup>, não foram encontrados ainda registros na literatura que apresentem metodologias de formulação de nanopartículas lipídicas sólidas utilizando estes solventes. Além de se tratar de uma tecnologia recente e inovadora, os NaDES's apresentam-se como solventes verdes resultantes da mistura de variados componentes orgânicos do metabolismo primário dos seres vivos. Devido à suas características químicas, estes solventes são vistos como alternativa ao uso de solventes tóxicos, podendo substituí-los em várias situações e atuar de forma mais biodegradável e biocompatível<sup>110,111</sup>. Por apresentar inércia química com a água, o NaDES permitiu a sua substituição em até 12,5% sem alterações

significativas de DH e PDI nas NLS desenvolvidas neste trabalho (Figura 8), tornando a metodologia de formulação ainda mais sustentável<sup>98</sup>.

Entretanto, apesar das vantagens apresentadas pelas nanopartículas lipídicas, elas ainda enfrentam algumas limitações que impedem a aplicação de alguns protocolos, como por exemplo o seu congelamento. Devido às tensões que ocorrem durante o processo de congelamento, juntamente com a formação de cristais de gelo, as NLS tendem a gerar agregados que levam ao aumento de seu tamanho e ao rompimento de sua estrutura, o que implica em sua degradação, sendo necessário, portanto, o uso de um crioprotetor<sup>112</sup>.

Os resultados do congelamento das NLS (Figura 9) demonstraram o potencial do NaDES utilizado no trabalho em atuar como crioprotetor nas formulações, evitando a degradação das partículas durante o congelamento e possibilitando o preparo da amostra para a concentração pela metodologia de liofilização. Estudos já demonstraram o potencial crioprotetor dos NaDES para sistemas biológicos, como as células, de modo que estes solventes atuam impedindo a formação de cristais de gelo ou amenizando este processo<sup>113-115</sup>. Entretanto, não havia sido demonstrado ainda a capacidade dos NaDES em atuar como crioprotetores também em nanossistemas, sendo este um ponto de destaque do presente trabalho.

A diferença entre os tipos de congelamento pode se dever principalmente à velocidade com que ocorrem, interferindo também na velocidade de formação dos cristais. No entanto, este não deve ser o único fator, visto que em congelamento rápido a  $-80^{\circ}\text{C}$  constatou-se degradação das partículas mas o congelamento a  $-196^{\circ}\text{C}$ , mesmo sendo instantâneo, manteve as propriedades das NLS para concentrações maiores do solvente, o que permite inferir também que a capacidade de crioproteção na formulação foi definida pelas quantidades do solvente, uma vez que maiores quantidades levam a maior estabilidade das NLS durante o processo.

As metodologias de secagem visando a concentração das nanopartículas também ilustram a importância e o impacto do solvente nas formulações, pois o NaDES contribuiu para a manutenção da estrutura e dos parâmetros coloidais das NLS mediante as condições de estresse. Isso pode ocorrer não apenas devido à sua capacidade crioprotetora, mas também devido à ligação que o solvente pode formar com a água, tornando o sistema mais estável, de modo que mesmo que as formulações com NaDES sejam degradadas, elas aparentam se manter mais resistentes a flutuações e variações do que as que não apresentam o solvente em sua formulação.

O trabalho demonstra que a secagem por vácuo e centrifugação (Figura 11), assim como a secagem por rotaevaporação (Figura 13) não resultaram em amostras viáveis, uma vez que levaram a

alterações nos parâmetros coloidais das nanopartículas, principalmente nos diâmetros hidrodinâmicos e na polidispersividade, o que poderia comprometer a sua funcionalidade e aplicação. Tais metodologias não foram encontradas na literatura como forma de concentração de nanopartículas, apenas como metodologias de formulação<sup>116,117</sup>.

A metodologia de liofilização (Figura 15) apresentou resultados satisfatórios, mesmo com o aumento no tamanho das partículas, pois apesar dos crioprotetores atuarem formando uma camada protetora ao redor das partículas, impedindo que elas se agreguem durante a remoção da água, muitas vezes um aumento no DH ainda ocorre, o que pode ser atribuído à força da ligação que estes crioprotetores fazem com a molécula de água, podendo ser mais forte ou mais fraca. Resultados similares foram observados também em outros trabalhos, que utilizaram diversos crioprotetores e observaram que o aumento no tamanho da partícula não interferiu nas demais aplicabilidades das NLS<sup>118-121</sup>. Entretanto, é importante ressaltar que em alguns casos a quantidade de crioprotetor necessária é bastante superior à utilizada no presente estudo<sup>122,123</sup>, o que lhe confere vantagens, visto que mesmo com baixa quantidade é possível obter resultados positivos, proporcionados pelo uso do solvente verde.

Vale destacar também que a forma de preparo das NLS, com metodologia de baixa energia e utilizando compostos da biodiversidade brasileira baseados em economia circular, permitiu o desenvolvimento de nanocarreadores de grande caráter inovador e baixo custo de produção. A baixa complexidade e o caráter sustentável do processo de produção das formulações de nanopartículas podem facilitar a transição da tecnologia desenvolvida do laboratório para a fabricação em larga escala, tornando mais propício o processo de escalonamento industrial<sup>124</sup>. Ademais, a reprodutibilidade do processo e a integridade das formulações compõem aspectos críticos para garantir a qualidade e a eficácia do produto final no âmbito industrial<sup>125</sup>.

A fim de se compreender melhor como a formulação das NLS com NaDES poderia interferir em suas propriedades, caracterizações físico-químicas foram realizadas. Os espectros de absorvância (Figura 19) e fluorescência (Figura 20) confirmam a manutenção das propriedades fluorescentes das NLS desenvolvidas, de modo que os picos de absorvância e fluorescência das amostras com ALPc encontram-se de acordo com achados da literatura, com absorção por volta de 680 nm, essencial para aplicação da TFD, como constatado por Muehlmann *et al.*, 2014<sup>126</sup>. Ressalta-se também a semelhança entre os espectros traçados para as NLS que não possuem NaDES e para as que apresentam o solvente em sua composição, o que pode indicar que a adição do solvente à formulação não implicou em

alteração nas propriedades de fluorescência das NLS, conseqüentemente, não interferindo na quantificação do fármaco.

A influência do solvente nas formulações desenvolvidas também se confirma pelos espectros obtidos por FTIR. Inicialmente, é importante ressaltar que, de acordo com o observado na Figura 21, a formulação do NaDES pôde ser constatada, dada a distinção entre os perfis espectrais do solvente e seus constituintes individuais, apresentando influência principalmente do glicerol, conforme reportado por Elderderi *et al.* (2020)<sup>127</sup>. Segundo Ghaedi *et al.* (2017)<sup>122</sup> e Ozturk *et al.* (2018)<sup>128,129</sup> picos de alta intensidade na banda de  $3300\text{ cm}^{-1}$  (1) indicam que houve formação de ligações de hidrogênio entre o doador e o aceptor de elétrons nos componentes que formam o NaDES, respectivamente, glicerol, ácido cítrico e cloreto de colina, de modo que os resultados obtidos corroboram com achados de Silva *et al.* (2020)<sup>98</sup>, que trabalhou com o mesmo NaDES em questão.

A incorporação do NaDES nas NLS formuladas sem e com o ativo AIPc, respectivamente Figura 22 e Figura 23, induziu modificações químicas notáveis aos nanossistemas, permitindo inferir que a incorporação do solvente ocorreu de forma adequada, sendo um resultado compatível com o objetivo pretendido nesta pesquisa, considerando a substituição parcial da água por este solvente. A similaridade apresentada pelos espectros das NLS contendo NaDES antes (NLS-AIPc-NaDES) e depois da ressuspensão em meio aquoso (NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res) sugere que a metodologia de concentração de partículas utilizada confere manutenção às formulações, realçado pelos grupamentos funcionais e perfis espectrais observados. Com isto, pode-se inferir que mesmo após o processo de liofilização as formulações avaliadas mantiveram-se íntegras, não apresentando indicativos significativos de degradação, o que destaca o potencial da liofilização como metodologia efetiva para a concentração de NLS contendo NaDES.

Relacionado a AIPc, também foco desta pesquisa, ainda que suprimida nos espectros de FTIR resultantes, desempenha um papel crucial na modificação do perfil espectral, juntamente com o NaDES, e atua promovendo diferenças nas posições (deslocamentos), larguras, intensidades e formatos dos picos, que podem não ficar visíveis devido à sobreposição (*overlapping*) entre as bandas da matriz lipídica e do ativo, conforme encontrado em estudos semelhantes com nanopartículas lipídicas desenvolvidos por Almeida *et al.* (2018)<sup>130</sup>, que atribuiu esse comportamento à baixa interação fármaco-lipídio.

A promissora aplicação das NLS com solvente verde desenvolvidas se dá também pela alta estabilidade coloidal que estas formulações apresentaram (Figura 17 Figura 18), mantendo-se estáveis por pelo menos 365 dias, o que é um ponto favorável à sua comercialização e armazenamento. A

estabilidade apresentada pelas NLS por longos períodos e a variadas condições, como a resistência ao congelamento, são aspectos fundamentais e que, pensando ainda no processo de escalonamento industrial, certamente influenciarão na redução de custos de armazenamento e transporte, fatores importantes para a viabilidade de comercialização de um produto<sup>131</sup>.

Algo a se questionar, no entanto, é a carga de superfície das partículas, que apresentam perfil mais neutro. De acordo com Subramaniam *et al.* (2020)<sup>132</sup> a carga de superfície ideal para nanopartículas deve ser superior a 30 (em módulo). Fato é que a composição das formulações interfere de forma significativa na carga de superfície das partículas, o que pode ter ocorrido devido à presença de compostos de carga neutra, como o Brij® O10, que é um surfactante não iônico<sup>133</sup>. Ademais, as partículas não apresentaram agregação a longo prazo, indicando que mesmo com carga neutra, a estabilidade não foi comprometida. Esta é uma discussão interessante de se abordar, visto que muitas vezes o ideal apresentado pela literatura não é atingido e por isso muitos resultados são interpretados de modo equivocado, interferindo em diversas outras análises.

Uma vez estável para armazenamento, buscamos compreender se as NLS se mantinham estáveis também ao longo de fluidos gastrointestinais simulados, tendo em vista o objetivo de torná-las uma plataforma/veículo para a administração oral no tratamento de melanoma. De maneira geral, tanto as NLS não liofilizadas quanto as submetidas à liofilização se mantiveram estáveis ao longo de todo o processo de digestão simulada (Figura 24). A estabilidade no tamanho das NLS indica que não houve degradação nem agregação das partículas, já que não houve diminuição nem aumento do DH. No FGS este fato se explica pela característica do surfactante utilizado na formulação, pois surfactantes não iônicos, devido à sua estrutura molecular, apresentam maior resistência a baixo pH, não apresentando floculação nem coalescência, deixando a formulação mais resistentes à ação da pepsina<sup>134,135</sup>.

Já em fluidos intestinais, devido à presença de enzimas digestivas de lipídios, pode haver hidrólise da camada de surfactante que reveste a nanopartícula, resultando em sua degradação e posterior agregação<sup>136,137</sup>. Apesar disso, as NLS apresentaram-se estáveis também em FIS, corroborando com os resultados obtidos por Han *et al.*, 2012<sup>102</sup>, em que lipossomas não sofrem alterações em seu tamanho quando presentes no mesmo fluido. Neste caso, a presença do solvente na formulação pode se tornar uma barreira física a mais de acesso às NLS, conferindo resistência à degradação lipídica, porém mais estudos são necessários para compreender melhor este fenômeno. Fato é que a estabilidade apresentada pelas NLS ao longo de todo o processo digestivo simulado indica que as partículas podem chegar ao intestino de forma íntegra e que a metodologia de concentração não

interferiu em seu comportamento, o que reafirma o potencial da metodologia para tornar-se uma plataforma de administração oral.

Por outro lado, a não degradação das nanopartículas no trato gastrointestinal, além de conferir vantagens quando se objetiva a entrega do fármaco em sítios distantes, pode também apresentar desvantagens, a depender da via de internalização<sup>138,139</sup>. Há nanopartículas que não são internalizadas em sua forma íntegra, tendo sua estrutura rompida e apenas o fármaco liberado. Entretanto, para este estudo em questão, ensaios prévios realizados pelo grupo de pesquisa<sup>101</sup> constataram que as NLS-AIPc são internalizadas integralmente pelas células tumorais, fato que torna interessante a sua resistência também aos fluidos gastrointestinais, possibilitando que a nanopartícula seja absorvida e chegue à região tumoral em sua forma íntegra. Contudo, investigar a via de internalização, assim como ensaios de simulação da absorção intestinal são necessários para possibilitar uma melhor compreensão também sobre o comportamento da NLS-AIPc-NaDES.

Para avaliar a morfologia das partículas resultantes da formulação com NaDES a fim de se elucidar sua estrutura, foram realizadas as microscopias eletrônicas de transmissão (Figura 25 e Figura 26) e varredura (Figura 27). Na MET observa-se diferentes padrões estabelecidos em decorrência da incorporação de AIPc na formulação, assim como encontrado por Mello *et al.* (2022)<sup>101</sup> nas formulações que não apresentam NaDES em sua composição. Seguindo este padrão, as NLS-Branca-NaDES apresentam-se mais eletrodensas, porém perdem o seu formato poliédrico, o que provavelmente ocorreu devido à presença do solvente. Para a NLS-AIPc-NaDES a estrutura se mantém muito similar a das NLS-AIPc, obtidas no trabalho anteriormente citado, com pequenas regiões mais escuras, o que se hipotetiza que seja a AIPc incorporada na matriz sólida das NLS. Para as NLS liofilizadas o padrão também se repete, indicando que o processo de liofilização não levou a alterações na morfologia das partículas. Entretanto, conforme esperado, há um aumento expressivo no tamanho, que também foi constatado pela MEV.

Ainda sobre o tamanho das partículas, um ponto interessante a se discutir é a diferença encontrada entre as técnicas utilizadas. A medição do tamanho das partículas feita pela técnica de espalhamento dinâmico da luz se baseia no diâmetro hidrodinâmico das partículas em suspensão, enquanto a microscopia eletrônica tem como base o diâmetro da partícula seca<sup>140</sup>. Assim, o que se espera é que o tamanho das partículas obtidas por DLS sejam maiores do que as obtidas por microscopia eletrônica em decorrência da camada de solvatação que as recobrem. Entretanto, o que obtivemos foi o oposto, a média do diâmetro obtido pelo DLS se apresentou menor do que o obtido por MET. Muitos podem ser os motivos para a diferença de tamanho encontrada, como o preparo para

a MET, onde as partículas podem secar e se aglomerar, permitindo a visualização de partículas com formatos maiores. Além disso, a técnica de DLS leva em consideração o formato esférico das partículas em movimento browniano, de modo que formatos esferoidais possam não ser idealmente representados<sup>141</sup>.

Como mencionado anteriormente, pela microscopia eletrônica foi possível observar o formato e a estrutura característica de NLS, com núcleos mais densos e o ativo encapsulado disperso neste núcleo lipídico, como é característico deste tipo de nanopartícula. Pensando desta forma e diante do caráter inovador da pesquisa desenvolvida com a adição de um NaDES às formulações, seria interessante também compreender como este solvente se organiza na estrutura das NLS. Entretanto, nem as técnicas de microscopias eletrônicas realizadas e nem o ensaio de FTIR possibilitaram a visualização da organização do NaDES na estrutura das partículas. Contudo, levando em consideração as características deste solvente e da formulação, é possível hipotetizar que, por se tratar de um solvente anfílico, que pode em alguns casos atuar substituindo as ligações da molécula de água, ele se encontra presente em suspensão juntamente com água, interagindo com a superfície das nanopartículas. E do mesmo modo que não é possível visualizar a camada de surfactante que recobre as partículas, também não conseguimos visualizá-lo. Fato é que, por ser uma nova associação, ainda são necessários mais ensaios para melhor compreensão sobre como este solvente está localizado na estrutura das NLS.

Uma vez caracterizadas, as NLS desenvolvidas neste trabalho foram submetidas a ensaios de viabilidade celular com células de melanoma murino para verificar a possível toxicidade apresentada por elas no tratamento de melanoma (Figura 28). A curva de viabilidade celular indica que o tratamento apresenta característica de dose-dependência, visto que conforme sua concentração aumenta, a viabilidade é reduzida. As células tumorais apresentaram alta sensibilidade ao tratamento, apresentando concentração inibitória de 50% (IC<sub>50</sub>) próxima de 2 nM para a maioria dos tratamentos, o que demonstra que baixas concentrações das nanopartículas são necessárias para promover a morte das células tumorais em comparação com outros estudos<sup>142,143</sup>.

Quando se compara a viabilidade celular entre os tratamentos no escuro e sob irradiação com TFD é possível observar que apesar de apresentar toxicidade semelhante, nos tratamentos irradiados a toxicidade se apresenta menor, com a NLS-AIPc-NaDES-Liof-Res sendo ainda mais tóxica do que a NLS-AIPc-NaDES sem liofilizar, o que reforça o fato de que a metodologia de concentração das nanopartículas não interferiu negativamente em sua toxicidade *in vitro* contra células de melanoma murino. O mesmo acontece para as NLS que contém NaDES em sua composição, as quais também apresentam atividade similar às que NLS que não possuem NaDES. Como observado também no teste

de viabilidade celular, o solvente sozinho apresenta toxicidade apenas em altas concentrações, o que permite atribuir à toxicidade às nanopartículas, além de possibilitar melhor entendimento de como estes solventes se comportam mediante cultivo celular, visto que a maioria de suas aplicações até então conhecidas estão voltadas para outras áreas de estudo.

É interessante destacar também que a NLS-Branca-NaDES apresenta toxicidade celular nos ensaios sem irradiação, entretanto, quando irradiada esta NLS deixa de ser tóxica, permitindo a proliferação das células tumorais, ainda que mínima. Esse aumento na quantidade de células viáveis quando irradiadas pode ocorrer devido ao fato de que a fototerapia também é utilizada como metodologia para induzir a cicatrização tecidual, pois a exposição das células a comprimentos de onda da luz vermelha e do infravermelho podem estimular a síntese de colágeno e modular a atividade celular<sup>144,145</sup>. No entanto, na presença do fármaco fotossensibilizante, não há aumento da proliferação celular, o que ressalta a importância de um FS para a terapia, assim como a seleção do melhor intervalo de concentração para o tratamento, visando evitar quaisquer efeitos indesejáveis da terapia.

Apesar de apresentar perfil tóxico para células de melanoma murino, o que torna o tratamento proposto um potencial tratamento para o câncer de pele melanoma, estudos com linhagens não tumorais são necessários para se afirmar a seletividade do fármaco utilizado para as células tumorais avaliadas, assim como uma melhor avaliação das condições de teste e intervalos de concentração.

Por se tratar de uma tecnologia inédita e inovadora, a combinação de NLS com NaDES representa um avanço significativo na pesquisa, podendo abrir novos caminhos para a formulação de nanopartículas em outras áreas terapêuticas, inclusive para outros cânceres. Por esse motivo, um pedido de patente está em processo de depósito, visando proteger a tecnologia desenvolvida e assegurar uma vantagem competitiva no mercado.

Assim, os resultados obtidos no presente trabalho podem vir a contribuir de modo significativo para melhor compreensão do papel dos solventes verdes na formulação de nanopartículas e no tratamento do câncer, podendo abrir portas para novas descobertas e direcionamento da aplicação dos nanomateriais, uma vez que o uso de NaDES e outros compostos naturais pode reduzir custos em comparação com solventes tradicionais, além de agregar valor à formulação devido à sua sustentabilidade e biodegradabilidade. Essas características ressaltam a evidência do impacto positivo da utilização dos solventes verdes, em especial os NaDES's, contribuindo para práticas mais sustentáveis nas variadas vertentes, e não apenas no contexto do câncer.

Mas vai muito além disso, trata-se de uma discussão vasta e uma busca global por um desenvolvimento mais sustentável no Brasil. Segundo a portaria de nº 1.122 do Ministério da Ciência,

Tecnologia, Inovações e Comunicações, projetos de pesquisa voltados para o desenvolvimento de tecnologias e inovações, como o presente trabalho, foram definidos como prioridade<sup>146</sup>. A necessidade por alternativas mais viáveis ao planeta é tão alta, que os objetivos da Organização das Nações Unidas (ONU) para 2030 envolvem justamente a proteção do meio ambiente com ações mais sustentáveis e baseadas em inovações<sup>147</sup>.

Portanto, os resultados obtidos na presente pesquisa fornecem evidências a respeito do desenvolvimento de formulações inéditas de nanopartículas lipídicas sólidas associadas a solvente verde como alternativa mais sustentável e biocompatível, apresentando grande potencial para se tornar uma plataforma para administração oral no tratamento de melanoma, além de contribuir com novas aplicações, tanto para o uso de NaDES quanto para as variadas vertentes da área de nanotecnologia, mostrando o quanto ambos têm a contribuir um com o outro e o quanto ainda há para ser explorado neste sentido.

## **7. Conclusão**

Os resultados obtidos nesta pesquisa nos permitem concluir que:

- Foi obtida formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo 12,5% de NaDES baseadas em metodologia de baixa energia e com alto valor agregado;
- Foi desenvolvido um fotossensibilizante de terceira geração a partir da associação de AIPc à formulação de nanopartículas lipídicas sólidas contendo NaDES;
- O NaDES utilizado atua como crioprotetor nas formulações de NLS desenvolvidas mediante congelamento a  $-20^{\circ}\text{C}$  e  $-196^{\circ}\text{C}$ ;
- A metodologia de secagem por liofilização foi a mais adequada para promover concentração das nanopartículas, permitindo o aumento de sua concentração em até três vezes sem o comprometimento de suas aplicações;
- As NLS desenvolvidas apresentaram estabilidade coloidal por pelo menos 360 dias;
- As NLS-AIPc e NLS-AIPc-NaDES apresentam intensa fluorescência e absorbância na região do espectro eletromagnético útil à terapia fotodinâmica antineoplásica;
- As NLS liofilizadas e ressuspensas mantiveram-se estáveis por pelo menos 8h em fluidos gastrointestinais simulados, indicando o seu alto potencial como plataforma para administração oral;

- As NLS-AIPc e NLS-AIPc-NaDES demonstraram potencial citotóxico em células tumorais de melanoma, sendo capazes de induzir morte celular mediante irradiação por TFD;
- Foi desenvolvida uma plataforma para administração oral no tratamento de melanoma baseada em sustentabilidade e promissora para o escalonamento industrial;
- O trabalho resultou em pesquisa inédita e inovadora associando o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas associadas a solventes verdes para o tratamento de melanoma.

## 8. Perspectivas

Como perspectivas para a continuidade da pesquisa pode ser sugerido:

- Avaliar a estabilidade coloidal a longo prazo das NLS liofilizadas;
- Avaliar a estabilidade coloidal das NLS desenvolvidas também em meio com mucina, simulando o ambiente bucal;
- Realizar o estudo de liberação da AIPc nos fluidos gastrointestinais simulados;
- Avaliar o comportamento das NLS desenvolvidas em células intestinais;
- Avaliar a viabilidade celular em linhagens da pele não tumorais após tratamento com as nanopartículas, a fim de se constatar o potencial de seletividade do tratamento proposto para as células de melanoma;
- Avaliar a biodegradabilidade e a toxicidade do NaDES a longo prazo em sistemas biológicos;
- Aplicar no sistema *in vivo* a plataforma de administração oral contendo o FS de 3ª geração em sua forma concentrada para quantificação por fluorescência na região tumoral.

## 9. Referências Bibliográficas

1. INCA. O que é câncer? (2022). Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Data de acesso: 10 de abril de 2024.
2. WHO. Cancer. (2021). Disponível em: [https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab\\_1](https://www.who.int/health-topics/cancer#tab=tab_1). Data de acesso: 12 de abril de 2024.
3. WEINBERG, R. A. *The Biology of Cancer*. (W. W. Norton & Company, 2023).
4. Hassanpour, S. H. & Dehghani, M. Review of cancer from perspective of molecular. *Journal of Cancer Research and Practice* **4**, 127–129 (2017).
5. Hanahan, D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* **12**, 31–46 (2022).
6. Girotti, M. R., Salatino, M., Dalotto-Moreno, T. & Rabinovich, G. A. Sweetening the hallmarks of cancer: Galectins as multifunctional mediators of tumor progression. *Journal of Experimental Medicine* **217**, (2020).
7. Anupam S, Manish K, Shailendra B, Vipin S & Anuj M. Cancer causes and treatments. *Internacional Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* **11**, 3109–22 (2020).
8. OPAS. Câncer. (2020).
9. OPAS. Carga global de câncer aumenta em meio à crescente necessidade de serviços. (2024).
10. International Agency for Research on Cancer. Absolute numbers of mortality in both sexes in 2022. (2022).
11. Primo, W. Q. S. P. National Cancer Institute and the 2023 -2025 Estimate – Cancer Incidence in Brazil. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia / RBGO Gynecology and Obstetrics* **45**, 001–002 (2023).
12. Observatório de Oncologia. Quanto custa tratar um paciente no SUS? (2023).
13. Ahmed, B., Qadir, M. I. & Ghafoor, S. Malignant Melanoma: Skin Cancer-Diagnosis, Prevention, and Treatment. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* **30**, 291–297 (2020).
14. Balch, C. M. *Cutaneous Melanoma*. (Springer International Publishing, Cham, 2020). doi:10.1007/978-3-030-05070-2.
15. Long, G. V, Swetter, S. M., Menzies, A. M., Gershenwald, J. E. & Scolyer, R. A. Cutaneous melanoma. *The Lancet* **402**, 485–502 (2023).
16. INCA. Câncer de pele melanoma. (2022).
17. Villani, A. *et al.* The Treatment of Advanced Melanoma: Therapeutic Update. *Int J Mol Sci* **23**, 6388 (2022).
18. International Agency for Research on Cancer. Absolute numbers of mortality in both sexes caused by melanoma in 2022. (2022).

19. Autier, P. & Doré, J.-F. Ultraviolet radiation and cutaneous melanoma: a historical perspective. *Melanoma Res* **30**, 113–125 (2020).
20. Dzwierzynski, W. W. Melanoma Risk Factors and Prevention. *Clin Plast Surg* **48**, 543–550 (2021).
21. Solano, F. Photoprotection and Skin Pigmentation: Melanin-Related Molecules and Some Other New Agents Obtained from Natural Sources. *Molecules* **25**, 1537 (2020).
22. Slominski, R. M., Zmijewski, M. A. & Slominski, A. T. The role of melanin pigment in melanoma. *Exp Dermatol* **24**, 258–259 (2015).
23. Slominski, R. M. *et al.* Melanoma, Melanin, and Melanogenesis: The Yin and Yang Relationship. *Front Oncol* **12**, (2022).
24. Brożyna, A. A., Józwicki, W., Roszkowski, K., Filipiak, J. & Slominski, A. T. Melanin content in melanoma metastases affects the outcome of radiotherapy. *Oncotarget* **7**, 17844–17853 (2016).
25. Brożyna, A. A., Józwicki, W., Carlson, J. A. & Slominski, A. T. Melanogenesis affects overall and disease-free survival in patients with stage III and IV melanoma. *Hum Pathol* **44**, 2071–2074 (2013).
26. Davis, L. E., Shalin, S. C. & Tackett, A. J. Current state of melanoma diagnosis and treatment. *Cancer Biol Ther* **20**, 1366–1379 (2019).
27. Naik, P. P. Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management. *World J Oncol* **12**, 7–19 (2021).
28. Debela, D. T. *et al.* New approaches and procedures for cancer treatment: Current perspectives. *SAGE Open Med* **9**, 205031212110343 (2021).
29. Bashraheel, S. S., Domling, A. & Goda, S. K. Update on targeted cancer therapies, single or in combination, and their fine tuning for precision medicine. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **125**, 110009 (2020).
30. Domingues, B., Lopes, J., Soares, P. & Populo, H. Melanoma treatment in review. *Immunotargets Ther* **7**, 35–49 (2018).
31. Kim, C. *et al.* Long-Term Survival in Patients with Metastatic Melanoma Treated with DTIC or Temozolomide. *Oncologist* **15**, 765–771 (2010).
32. Tan, S., Li, D. & Zhu, X. Cancer immunotherapy: Pros, cons and beyond. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **124**, 109821 (2020).
33. Darwin, P., Toor, S. M., Sasidharan Nair, V. & Elkord, E. Immune checkpoint inhibitors: recent progress and potential biomarkers. *Exp Mol Med* **50**, 1–11 (2018).
34. Teimouri, F., Nikfar, S. & Abdollahi, M. Efficacy and side effects of dacarbazine in comparison with temozolomide in the treatment of malignant melanoma. *Melanoma Res* **23**, 381–389 (2013).
35. Jenkins, R. W., Barbie, D. A. & Flaherty, K. T. Mechanisms of resistance to immune checkpoint inhibitors. *Br J Cancer* **118**, 9–16 (2018).

36. Algorri, J. F., Ochoa, M., Roldán-Varona, P., Rodríguez-Cobo, L. & López-Higuera, J. M. Photodynamic Therapy: A Compendium of Latest Reviews. *Cancers (Basel)* **13**, 4447 (2021).
37. Baldea, L. & Filip, A. G. Photodynamic therapy in melanoma—an update. *Journal of Physiology and pharmacology* **63**, 109 (2012).
38. Correia, J. H., Rodrigues, J. A., Pimenta, S., Dong, T. & Yang, Z. Photodynamic Therapy Review: Principles, Photosensitizers, Applications, and Future Directions. *Pharmaceutics* **13**, 1332 (2021).
39. Niculescu, A.-G. & Grumezescu, A. M. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. *Applied Sciences* **11**, 3626 (2021).
40. DeRosa, M. Photosensitized singlet oxygen and its applications. *Coord Chem Rev* **233–234**, 351–371 (2002).
41. Niculescu, A.-G. & Grumezescu, A. M. Photodynamic Therapy—An Up-to-Date Review. *Applied Sciences* **11**, 3626 (2021).
42. Panzarini, E., Inguscio, V. & Dini, L. Immunogenic Cell Death: Can It Be Exploited in PhotoDynamic Therapy for Cancer? *Biomed Res Int* **2013**, 1–18 (2013).
43. Henderson, B. W. *Photodynamic Therapy: Basic Principles and Clinical Applications*. (2020).
44. Santos, G. P. Uso da Terapia Fotodinâmica no tratamento do Paciente oncológico: revisão de literatura. (Universidade Federal de Goiás, Itajaí, 2018).
45. Gunaydin, G., Gedik, M. E. & Ayan, S. Photodynamic Therapy—Current Limitations and Novel Approaches. *Front Chem* **9**, (2021).
46. Kim, T. E. & Chang, J.-E. Recent Studies in Photodynamic Therapy for Cancer Treatment: From Basic Research to Clinical Trials. *Pharmaceutics* **15**, 2257 (2023).
47. Huis in ‘t Veld, R. V. *et al.* Current Challenges and Opportunities of Photodynamic Therapy against Cancer. *Pharmaceutics* **15**, 330 (2023).
48. Park, J., Lee, Y.-K., Park, I.-K. & Hwang, S. R. Current Limitations and Recent Progress in Nanomedicine for Clinically Available Photodynamic Therapy. *Biomedicines* **9**, 85 (2021).
49. Goto, P. L., Siqueira-Moura, M. P. & Tedesco, A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. *Int J Pharm* **518**, 228–241 (2017).
50. Yahya, M., Nural, Y. & Seferoğlu, Z. Recent advances in the nonlinear optical (NLO) properties of phthalocyanines: A review. *Dyes and Pigments* **198**, 109960 (2022).
51. Sharma, S. K., Huang, Y.-Y. & Hamblin, M. R. Melanoma Resistance to Photodynamic Therapy. in 229–246 (2015). doi:10.1007/978-3-319-12730-9\_11.
52. Li, X.-Y. *et al.* Susceptibility and Resistance Mechanisms During Photodynamic Therapy of Melanoma. *Front Oncol* **10**, (2020).
53. Younus, L. A. *et al.* Photodynamic therapy in cancer treatment: properties and applications in nanoparticles. *Brazilian Journal of Biology* **84**, (2024).

54. Obaid, G. *et al.* Photonanomedicine: a convergence of photodynamic therapy and nanotechnology. *Nanoscale* **8**, 12471–12503 (2016).
55. Mfouo-Tynga, I. S., Dias, L. D., Inada, N. M. & Kurachi, C. Features of third generation photosensitizers used in anticancer photodynamic therapy: Review. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **34**, 102091 (2021).
56. Haleem, A., Javaid, M., Singh, R. P., Rab, S. & Suman, R. Applications of nanotechnology in medical field: a brief review. *Global Health Journal* **7**, 70–77 (2023).
57. Malik, S., Muhammad, K. & Waheed, Y. Nanotechnology: A Revolution in Modern Industry. *Molecules* **28**, 661 (2023).
58. Jin, C., Wang, K., Oppong-Gyebi, A. & Hu, J. Application of Nanotechnology in Cancer Diagnosis and Therapy - A Mini-Review. *Int J Med Sci* **17**, 2964–2973 (2020).
59. Najahi-Missaoui, W., Arnold, R. D. & Cummings, B. S. Safe Nanoparticles: Are We There Yet? *Int J Mol Sci* **22**, 385 (2021).
60. Gavas, S., Quazi, S. & Karpiński, T. M. Nanoparticles for Cancer Therapy: Current Progress and Challenges. *Nanoscale Res Lett* **16**, 173 (2021).
61. Masserini, M. Nanoparticles for Brain Drug Delivery. *ISRN Biochem* **2013**, 1–18 (2013).
62. Lasa-Saracibar, B., Estella-Hermoso de Mendoza, A., Guada, M., Dios-Vieitez, C. & Blanco-Prieto, M. J. Lipid nanoparticles for cancer therapy: state of the art and future prospects. *Expert Opin Drug Deliv* **9**, 1245–1261 (2012).
63. Mathur, V. *et al.* Solid lipid nanoparticles in cancer therapy. *International Journal of Drug Delivery* **2**, 192–199 (2010).
64. Almawash, S. Solid lipid nanoparticles, an effective carrier for classical antifungal drugs. *Saudi Pharmaceutical Journal* **31**, 1167–1180 (2023).
65. Pardeshi, C. *et al.* Solid lipid based nanocarriers: An overview. *Acta Pharmaceutica* **62**, 433–472 (2012).
66. Parhi, R. & Suresh, P. Preparation and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles-A Review. *Curr Drug Discov Technol* **9**, 2–16 (2012).
67. Javadzadeh, Y. & Yaqoubi, S. Therapeutic nanostructures for pulmonary drug delivery. in *Nanostructures for Drug Delivery* 619–638 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-323-46143-6.00020-8.
68. Lucks, S. & Müller, R. Arzneistoffträger aus festen lipidteilchen (feste lipidnanosphären (sln)). (1993).
69. Urkunde, A. S., Atram, C. S., Sable, P. R., Rajput, J. Vrunda & Gawai, G. A. A Comprehensive Review on Solid Lipid Nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Research and Development* **12**, 45–54 (2024).
70. Viegas, C. *et al.* Solid Lipid Nanoparticles vs. Nanostructured Lipid Carriers: A Comparative Review. *Pharmaceutics* **15**, 1593 (2023).

71. Lu, B., Xiong, S.-B., Yang, H., Yin, X.-D. & Chao, R.-B. Solid lipid nanoparticles of mitoxantrone for local injection against breast cancer and its lymph node metastases. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **28**, 86–95 (2006).
72. More, S. D., Wadhokar, A. S. & Bedjawalge, R. S. A Review on Solid Lipid Nanoparticles as Nano Drug Delivery Transporters. *Curr Nanosci* **20**, 644–670 (2024).
73. Salah, E., Abouelfetouh, M. M., Pan, Y., Chen, D. & Xie, S. Solid lipid nanoparticles for enhanced oral absorption: A review. *Colloids Surf B Biointerfaces* **196**, 111305 (2020).
74. UFSC. Preparo e Administração de Medicação por Via Oral. 2016 (2016).
75. Gibaldi, M. & Perrier, D. Route of Administration and Drug Disposition. *Drug Metab Rev* **3**, 185–199 (2008).
76. Kim, J. & De Jesus, O. *Medication Routes of Administration*. (2021).
77. Sahoo, D. *et al.* Oral drug delivery of nanomedicine. in *Theory and Applications of Nonparenteral Nanomedicines* 181–207 (Elsevier, 2021). doi:10.1016/B978-0-12-820466-5.00009-0.
78. Mu, H., Holm, R. & Müllertz, A. Lipid-based formulations for oral administration of poorly water-soluble drugs. *Int J Pharm* **453**, 215–224 (2013).
79. Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I. & Jokić, S. Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology* **90**, 1631–1639 (2015).
80. Capello, C., Fischer, U. & Hungerbühler, K. What is a green solvent? A comprehensive framework for the environmental assessment of solvents. *Green Chemistry* **9**, 927 (2007).
81. Gu, Y. & Jérôme, F. Bio-based solvents: an emerging generation of fluids for the design of eco-efficient processes in catalysis and organic chemistry. *Chem Soc Rev* **42**, 9550 (2013).
82. Schuh, L. *et al.* From Nature to Innovation: The Uncharted Potential of Natural Deep Eutectic Solvents. *Molecules* **28**, 7653 (2023).
83. Häckl, K. & Kunz, W. Some aspects of green solvents. *Comptes Rendus. Chimie* **21**, 572–580 (2018).
84. Freemantle, M. *An Introduction to Ionic Liquids*. (Royal Society of Chemistry., 2010).
85. Vanda, H., Dai, Y., Wilson, E. G., Verpoorte, R. & Choi, Y. H. Green solvents from ionic liquids and deep eutectic solvents to natural deep eutectic solvents. *Comptes Rendus. Chimie* **21**, 628–638 (2018).
86. Smith, E. L., Abbott, A. P. & Ryder, K. S. Deep Eutectic Solvents (DESs) and Their Applications. *Chem Rev* **114**, 11060–11082 (2014).
87. El Achkar, T., Greige-Gerges, H. & Fourmentin, S. Basics and properties of deep eutectic solvents: a review. *Environ Chem Lett* **19**, 3397–3408 (2021).
88. Hansen, B. B. *et al.* Deep Eutectic Solvents: A Review of Fundamentals and Applications. *Chem Rev* **121**, 1232–1285 (2021).

89. Paiva, A. *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. *ACS Sustain Chem Eng* **2**, 1063–1071 (2014).
90. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R. & Choi, Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61–68 (2013).
91. Carriazo, D., Serrano, M. C., Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L. & del Monte, F. Deep-eutectic solvents playing multiple roles in the synthesis of polymers and related materials. *Chem Soc Rev* **41**, 4996 (2012).
92. Choi, Y. H. *et al.* Are Natural Deep Eutectic Solvents the Missing Link in Understanding Cellular Metabolism and Physiology? *Plant Physiol* **156**, 1701–1705 (2011).
93. Liu, Y. *et al.* Natural Deep Eutectic Solvents: Properties, Applications, and Perspectives. *J Nat Prod* **81**, 679–690 (2018).
94. Goto, P. L., Siqueira-Moura, M. P. & Tedesco, A. C. Application of aluminum chloride phthalocyanine-loaded solid lipid nanoparticles for photodynamic inactivation of melanoma cells. *Int J Pharm* **518**, 228–241 (2017).
95. Moura, L. Tratamento de câncer de mama utilizando terapia fotodinâmica com nonoemulsões de Ftalocianina de cloro alumínio. (Universidade de Brasília, 2017).
96. Py-Daniel, K. Desenvolvimento e aplicação biológica de nanossistemas contendo o fotossensibilizante cloreto de alumínio ftalocianina. (Universidade de Brasília, 2017).
97. *Resolução Normativa Nº 33, de Novembro de 2016.* (Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasil, 2016).
98. Silva, D. T. da *et al.* Natural deep eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins. *Journal of Food Composition and Analysis* **89**, 103470 (2020).
99. Gao, S. & McClements, D. J. Formation and stability of solid lipid nanoparticles fabricated using phase inversion temperature method. *Colloids Surf A Physicochem Eng Asp* **499**, 79–87 (2016).
100. Anton, N. & Vandamme, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int J Pharm* **377**, 142–147 (2009).
101. Mello, V. C. *et al.* Development of New Natural Lipid-Based Nanoparticles Loaded with Aluminum-Phthalocyanine for Photodynamic Therapy against Melanoma. *Nanomaterials* **12**, 3547 (2022).
102. Han, H.-K., Shin, H.-J. & Ha, D. H. Improved oral bioavailability of alendronate via the mucoadhesive liposomal delivery system. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* **46**, 500–507 (2012).
103. Amazon Oil. Manteiga de Murumuru - *Astrocaryum muru-muru*. (2020).
104. Tas, F. & Erturk, K. Recurrence behavior in early-stage cutaneous melanoma: pattern, timing, survival, and influencing factors. *Melanoma Res* **27**, 134–139 (2017).
105. von Schuckmann, L. A. *et al.* Risk of Melanoma Recurrence After Diagnosis of a High-Risk Primary Tumor. *JAMA Dermatol* **155**, 688–693 (2019).

106. Dong, X. D., Tyler, D., Johnson, J. L., DeMatos, P. & Seigler, H. F. Analysis of prognosis and disease progression after local recurrence of melanoma. *Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society* **88**, 1063–1071 (2000).
107. Deng, Y. *et al.* Magnetic nanoparticles prepared in natural deep eutectic solvent for enzyme immobilisation. *Biocatal Biotransformation* **40**, 450–460 (2022).
108. Skiba, M. & Vorobyova, V. Green synthesis and characterization of silver nanoparticles using *Prunus persica* L. (peach pomace) with natural deep eutectic solvent and plasma-liquid process. *Chemical Papers* **76**, 5789–5806 (2022).
109. Zhong, C., Luo, S., Ye, J. & Liu, C. Shape and size-controlled starch nanoparticles prepared by self-assembly in natural deep eutectic solvents: Effect and mechanism. *Food Hydrocoll* **139**, 108525 (2023).
110. Dai, Y., van Spronsen, J., Witkamp, G.-J., Verpoorte, R. & Choi, Y. H. Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Anal Chim Acta* **766**, 61–68 (2013).
111. Cunha, S. C. & Fernandes, J. O. Extraction techniques with deep eutectic solvents. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **105**, 225–239 (2018).
112. Heurtault, B. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* **24**, 4283–4300 (2003).
113. Jesus, A. R., Meneses, L., Duarte, A. R. C. & Paiva, A. Natural deep eutectic systems, an emerging class of cryoprotectant agents. *Cryobiology* **101**, 95–104 (2021).
114. Castro, V. I. B. *et al.* Natural deep eutectic systems as alternative nontoxic cryoprotective agents. *Cryobiology* **83**, 15–26 (2018).
115. Jesus, A. R., Duarte, A. R. C. & Paiva, A. Use of natural deep eutectic systems as new cryoprotectant agents in the vitrification of mammalian cells. *Sci Rep* **12**, 8095 (2022).
116. Steiner, D. & Bunjes, H. Influence of process and formulation parameters on the preparation of solid lipid nanoparticles by dual centrifugation. *Int J Pharm X* **3**, 100085 (2021).
117. Rampaka, R., Ommi, K. & Chella, N. Role of solid lipid nanoparticles as drug delivery vehicles on the pharmacokinetic variability of Erlotinib HCl. *J Drug Deliv Sci Technol* **66**, 102886 (2021).
118. del Pozo-Rodríguez, A., Solinís, M. A., Gascón, A. R. & Pedraz, J. L. Short- and long-term stability study of lyophilized solid lipid nanoparticles for gene therapy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **71**, 181–189 (2009).
119. Schwarz, C. & Mehnert, W. Freeze-drying of drug-free and drug-loaded solid lipid nanoparticles (SLN). *Int J Pharm* **157**, 171–179 (1997).
120. Howard, M. D., Lu, X., Jay, M. & Dziubla, T. D. Optimization of the lyophilization process for long-term stability of solid-lipid nanoparticles. *Drug Dev Ind Pharm* **38**, 1270–1279 (2012).
121. Amekyeh, H. & Billa, N. Lyophilized Drug-Loaded Solid Lipid Nanoparticles Formulated with Beeswax and Theobroma Oil. *Molecules* **26**, 908 (2021).

122. Varshosaz, J. *et al.* Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid nanoparticles using D-optimal experimental design. *Pharm Dev Technol* **17**, 187–194 (2012).
123. Amis, T. M., Renukuntla, J., Bolla, P. K. & Clark, B. A. Selection of Cryoprotectant in Lyophilization of Progesterone-Loaded Stearic Acid Solid Lipid Nanoparticles. *Pharmaceutics* **12**, 892 (2020).
124. Shegokar, R. & Nakach, M. Large-scale manufacturing of nanoparticles—An industrial outlook. in *Drug Delivery Aspects* 57–77 (Elsevier, 2020). doi:10.1016/B978-0-12-821222-6.00004-X.
125. Stark, W. J., Stoessel, P. R., Wohlleben, W. & Hafner, A. Industrial applications of nanoparticles. *Chem Soc Rev* **44**, 5793–5805 (2015).
126. Muehlmann, L., Ma, B., Longo, J., Santos, M. & Azevedo, R. Aluminum–phthalocyanine chloride associated to poly(methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. *Int J Nanomedicine* **9**, 1199–1213 (2014).
127. Elderderi, S. *et al.* ATR-IR spectroscopy for rapid quantification of water content in deep eutectic solvents. *J Mol Liq* **311**, 113361 (2020).
128. Ghaedi, H., Ayoub, M., Sufian, S., Lal, B. & Uemura, Y. Thermal stability and FT-IR analysis of Phosphonium-based deep eutectic solvents with different hydrogen bond donors. *J Mol Liq* **242**, 395–403 (2017).
129. Ozturk, B., Parkinson, C. & Gonzalez-Miquel, M. Extraction of polyphenolic antioxidants from orange peel waste using deep eutectic solvents. *Sep Purif Technol* **206**, 1–13 (2018).
130. Almeida, E. D. P. *et al.* Skin permeation, biocompatibility and antitumor effect of chloroaluminum phthalocyanine associated to oleic acid in lipid nanoparticles. *Photodiagnosis Photodyn Ther* **24**, 262–273 (2018).
131. Hu, C. *et al.* Industrialization of lipid nanoparticles: From laboratory-scale to large-scale production line. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **109**, 206–213 (2016).
132. Subramaniam, B., Siddik, Z. H. & Nagoor, N. H. Optimization of nanostructured lipid carriers: understanding the types, designs, and parameters in the process of formulations. *Journal of Nanoparticle Research* **22**, 1–29 (2020).
133. Gagliardi, A., Voci, S., Salvatici, M. C., Fresta, M. & Cosco, D. Brij-stabilized zein nanoparticles as potential drug carriers. *Colloids Surf B Biointerfaces* **201**, 111647 (2021).
134. Müller, R. H., Rühl, D. & Runge, S. A. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *Int J Pharm* **144**, 115–121 (1996).
135. van Aken, G. A., Bomhof, E., Zoet, F. D., Verbeek, M. & Oosterveld, A. Differences in in vitro gastric behaviour between homogenized milk and emulsions stabilised by Tween 80, whey protein, or whey protein and caseinate. *Food Hydrocoll* **25**, 781–788 (2011).
136. Aditya, N. P. *et al.* Curcumin and Genistein Coloaded Nanostructured Lipid Carriers: in Vitro Digestion and Antiprostata Cancer Activity. *J Agric Food Chem* **61**, 1878–1883 (2013).

137. Noack, A., Oidtmann, J., Kutza, J. & Mäder, K. In vitro digestion of curcuminoid-loaded lipid nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research* **14**, 1113 (2012).
138. Yuan, H., Chen, C.-Y., Chai, G., Du, Y.-Z. & Hu, F.-Q. Improved Transport and Absorption through Gastrointestinal Tract by PEGylated Solid Lipid Nanoparticles. *Mol Pharm* **10**, 1865–1873 (2013).
139. Lv Hui-Xia, H. *et al.* Solid lipid nanoparticles modified with stearic acid&ndash;octaarginine for oral administration of insulin. *Int J Nanomedicine* 3333 (2012) doi:10.2147/IJN.S31711.
140. Bhattacharjee, S. DLS and zeta potential – What they are and what they are not? *Journal of Controlled Release* **235**, 337–351 (2016).
141. Kumar, S. & Randhawa, J. K. Preparation and characterization of Paliperidone loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* **102**, 562–568 (2013).
142. Rodrigues, M. C. *et al.* Photodynamic therapy mediated by aluminium-phthalocyanine nanoemulsion eliminates primary tumors and pulmonary metastases in a murine 4T1 breast adenocarcinoma model. *J Photochem Photobiol B* **204**, 111808 (2020).
143. Barbosa, H. F. G. *et al.* Hybrid lipid-biopolymer nanocarrier as a strategy for GBM photodynamic therapy (PDT). *Int J Biol Macromol* **242**, 124647 (2023).
144. Ma, H., Yang, J.-P., Tan, R. K., Lee, H.-W. & Han, S.-K. Effect of Low-Level Laser Therapy on Proliferation and Collagen Synthesis of Human Fibroblasts in Vitro. *Journal of Wound Management and Research* **14**, 1–6 (2018).
145. Xu, Y., Chen, H., Fang, Y. & Wu, J. Hydrogel Combined with Phototherapy in Wound Healing. *Adv Healthc Mater* **11**, 2200494 (2022).
146. MCTIC. Portaria MCTIC nº 1.122, de 19.03.2020. (2020).
147. ONU. Objetivos de Desenvolvimento Sustentável. (2024).