

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM NANOCIÊNCIA E NANOBIOTECNOLOGIA

Desenvolvimento de nanopartícula lipídica sólida à base de manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para carreamento de cloreto de alumínio-ftalocianina em terapia fotodinâmica anticâncer.

Nelice Roberta da Silva Costa

Brasília

2021

Nelice Roberta da Silva Costa

Desenvolvimento de nanopartícula lipídica sólida à base de manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para carreamento de cloreto de alumínio-ftalocianina em terapia fotodinâmica anticâncer.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Nanociência e Nanobiotecnologia.

Orientador: Dr. João Paulo Figueiró Longo

RESUMO

Entre as diversas abordagens terapêuticas contra o câncer, a terapia fotodinâmica (TFD) destaca-se por ser uma técnica menos invasiva, mais seletiva e específica. A combinação de fotossensibilizantes (FS) com nanomateriais tem melhorado a eficiência da TFD. Assim, o presente trabalho teve como objetivo utilizar reagentes de proveniência natural, especificamente manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), na composição de nanossistemas para serem associados a FS já utilizados em terapia fotodinâmica anticâncer, no caso, cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl). Os resultados obtidos revelaram nanopartículas eficientes para o carreamento de AlFtCl, alta estabilidade inicial quando estocadas a temperatura ambiente ou a 4 °C, diâmetro hidrodinâmico (DH) menor que 100 nm e índice de polidispersão (IPD) < 0.2. A nanopartícula lipídica sólida de manteiga de murumuru associada a AlFtCl na concentração de 20 µM (NLSM-AlFtCl-20) apresentou excelente atividade fotodinâmica e ausência de toxicidade quando não irradiada. Além disso, as células de melanoma murino B16F10, quando tratadas com NLSM-AlFtCl-20 apresentaram características morfológicas semelhantes às apresentadas pelas células tratadas com mitoxantrona (MTX), um quimioterápico com potencial indutor de apoptose. O nanossistema proposto além de fornecer informações importantes para o desenvolvimento de protocolos clínicos mais eficientes de terapia anticâncer, promove o fortalecimento das cadeias de valor da biodiversidade amazônica, uma das maiores potencialidades bioeconômicas do país.

Palavras-chaves: nanotecnologia, terapia fotodinâmica, bioeconomia, melanoma, *in vitro*.

ABSTRACT

Among the various therapeutic approaches against cancer, photodynamic therapy (PDT) stands out for being a less invasive, more selective and specific technique. The combination of photosensitizers (FS) with nanomaterials has improved the efficiency of PDT. Thus, the present work aimed to use reagents of natural origin, specifically murumuru butter (*Astrocaryum murumuru*), in the composition of nanosystems to be associated with FS already used in anti-cancer photodynamic therapy, in this case, aluminum chloride-phthalocyanine (AlFtCl). The results obtained revealed efficient nanoparticles for carrying AlFtCl, high initial stability when stored at room temperature or at 4 ° C, hydrodynamic diameter (DH) less than 100 nm and polydispersion index (IPD) <0.2. The solid lipid nanoparticle of murumuru butter associated with AlFtCl at a concentration of 20 µM (NLSM-AlFtCl-20) showed excellent photodynamic activity and absence of toxicity when not irradiated. In addition, murine melanoma cells B16F10, when treated with NLSM-AlFtCl-20, presented morphological characteristics similar to those presented by cells treated with mitoxantrone (MTX), a chemotherapy with potential for apoptosis inducing. The proposed nanosystem, in addition to providing important information for the development of more efficient clinical protocols for anticancer therapy, promotes the strengthening of the value chains of Amazonian biodiversity, one of the greatest bioeconomic potentials in the country.

Keywords: nanotechnology, photodynamic therapy, bioeconomics, melanoma, *in vitro*.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da aplicação de NLSs como carreadores de fármacos.....	17
Tabela 2 – Dados físico-químicos da manteiga de murumuru	25
Tabela 3 – Composição dos ácidos graxos do murumuru	26
Tabela 4 – Comportamento de estabilidade do coloide com base no valor do potencial zeta.	38

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Representação esquemática do método PIT. Em temperatura relativamente baixa (A), os grupos da cabeça do tensoativo são altamente hidratados, o que favorece a formação de sistemas L / A. Com o aumento da temperatura, atinge-se um ponto crítico denominado temperatura de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (B). Neste ponto, a solubilidade do tensoativo nas fases lipídicas e aquosas é aproximadamente igual, as tensões superficiais são extremamente baixas e o sistema aparece translúcido. Em alta temperatura (C), a cabeça polar do tensoativo encontra-se altamente desidratada, o que favorece a formação de sistemas A / L (Adaptado de JINTAPATTANAKIT, 2018). 21
- Figura 2 – Representação esquemática da relação entre temperatura, taxa de coalescência e tensão superficial na formação de nanossistemas pelo método PIT (Adaptado de JINTAPATTANAKIT, 2018). 22
- Figura 3 – Cocos de murumuru (Adaptado de SOS AMAZÔNIA, 2018). 25
- Figura 4 – Análise das propriedades coloidais das NLSM obtidas com a variação na razão lipídio/tensoativo. Fica evidente que há uma tendência de o aumento de lipídios no sistema promover aumento de DH e IPD. Os quadrados em vermelho representam os dados de DH, e os círculos azuis representam os dados referentes ao IPD. Os dados estão representados como média e desvio padrão da média. 34
- Figura 5 – Avaliação do DH e do IPD nas NLSM formuladas com diferentes quantidades de água destilada. Os quadrados em vermelho representam os dados de DH, e os círculos azuis representam os dados referentes IPD. Os dados estão representados como média e desvio padrão da média. 36
- Figura 6 – Relação temperatura/DH/IPD. Os menores valores de DH e IPD foram verificados nas formulações com temperatura PIT próxima a 80 °C. Os quadrados em vermelho representam os dados de DH, e os círculos azuis representam os dados referentes ao IPD. Os dados estão representados como média e desvio padrão da média. 37
- Figura 7 – A variação da concentração de AIFtCl nas NLSM-AIFtCl não resultou em diferenças significantes no tamanho médio das partículas e nem na média de polidispersividade. 37
- Figura 8 – A variação da concentração de AIFtCl nas NLSM-AIFtCl não resultou em diferenças significantes no potencial zeta das formulações. 38
- Figura 9 – Resultado da análise da absorvância da NLSM e das NLSM-AIFtCl obtidas. NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40 apresentaram picos de absorvância próximos a 680 nm. 40

Figura 10 – Resultado da análise da fluorescência (excitação 400 nm) da NLSM e das NLSM-AIFtCl obtidas. Picos relacionados às NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40, próximo a 680 nm (683 e 682 nm, respectivamente).	40
Figura 11 – Produção de ERO's pelo método de degradação do DBF para as diferentes concentrações de FS associadas às NLSM.	43
Figura 12 – Estabilidade NLSM pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 60 dias, à T.A., 37°C e 4° C.	45
Figura 13 – Estabilidade NLSM-AIFtCl-20 pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 60 dias, à T.A., 37°C e 4° C.	46
Figura 14 – Estabilidade NLSM-AIFtCl-40 pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 60 dias, à T.A., 37°C e 4° C.	47
Figura 15 – Viabilidade de células B16F10 expostas a NLSM, a NLSM-AIFtCl-20 e a NLSM-AIFtCl-40, avaliada pelo método MTT 24h após tratamento. (A) Células tratadas mantidas no escuro; (B) Células tratadas e irradiadas por LED (660nm, 25.88 J/cm ²).	49
Figura 16 – Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para analisar a atividade fotodinâmica da NLSM-AIFtCl-20. (A) Morfologia das células contendo apenas meio de cultivo; (B) Morfologia das células tratadas com NLSM-AIFtCl-20 IC50 no escuro; (C) Morfologia das células tratadas com NLSM-AIFtCl-20 IC50 irradiadas; (D) Morfologia das células tratadas com MTX como controle positivo para apoptose.....	51

ABREVIATURAS

AlFtCl	Cloreto de alumínio-ftalocianina
B16F10	Células de melanoma murino
CMC	Concentração Micelar Crítica
DBF	1,3-difenil-isobenzofurano
DH	Diâmetro hidrodinâmico
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FS	Fotossensibilizante
Ft	Ftalocianina
IC50	Índice de citotoxicidade de 50%
IPD	Índice de polidispersão
J/cm ²	Dose de energia em Jaules por centímetro ao quadrado
LED	Diodo emissor de luz
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MTT	Brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio
MTX	Mitoxantrona
NLSM	Nanopartícula lipídica sólida de manteiga de murumuru
NLSM-AlFtCl	Nanopartícula lipídica sólida de manteiga de murumuru associada a cloreto de alumínio-ftalocianina
NLSM-AlFtCl-20	Nanopartícula lipídica sólida de manteiga de murumuru associada a cloreto de alumínio-ftalocianina na concentração de 20 µM
NLSM-AlFtCl-40	Nanopartícula lipídica sólida de manteiga de murumuru associada a cloreto de alumínio-ftalocianina na concentração de 40 µM
NLSs	Nanopartículas lipídicas sólidas
nm	Nanômetros
nM	Nanomolar
PBS	Solução salina
PIT	Inversão de fases por temperatura ou temperatura na qual ocorre a inversão de fases
PZ	Potencial zeta
TA	Temperatura ambiente - aproximadamente 25 °C
TFD	Terapia fotodinâmica
λ	Comprimentos de onda de luz
µM	Micromolar

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1. Tratamentos Anticâncer	11
1.2. Nanotecnologia e Terapia Fotodinâmica	11
1.2.1. <i>FOTOSENSIBILIZANTES</i>	13
1.2.2. <i>NANOCARREADORES</i>	16
1.2.3. <i>NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS</i>	16
1.2.4. <i>MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NLSs</i>	19
1.2.4.1. <i>Agentes Estabilizantes Utilizados na Síntese de NLSs</i>	22
1.3. Bioeconomia, Química Verde e Sociobiodiversidade	23
1.3.1. <i>MANTEIGA DE MURUMURU</i>	24
2. JUSTIFICATIVA	26
3. OBJETIVOS	26
3.1. Objetivo Geral	26
3.2. Objetivos Específicos	27
4. MATERIAIS E MÉTODOS	28
4.1. Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	28
4.1.1. <i>PREPARO DA NLS CONTENDO FOTOSENSIBILIZANTE</i>	28
4.1.2. <i>CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DA NLS</i>	29
4.1.2.1. <i>Propriedades Coloidais</i>	29
4.1.2.2. <i>Propriedades Foto-físicas</i>	30
4.1.2.3. <i>Propriedades Físico-Químicas (Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio)</i>	30
4.1.2.4. <i>Estabilidade sob Armazenamento</i>	31
4.2. Ensaio <i>In Vitro</i> para a Avaliação da Segurança e Eficácia	31
4.2.1. <i>CULTIVO CELULAR</i>	31
4.2.2. <i>DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR</i>	32
4.2.3. <i>ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS TRATADAS</i>	33
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	34
5.1. Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas	34
5.1.1. <i>PROPRIEDADES COLOIDAIAS</i>	34
5.1.2. <i>PROPRIEDADES FOTO-FÍSICAS</i>	39

5.1.3.	<i>PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS</i>	41
5.1.4.	<i>ESTABILIDADE SOB ARMAZENAMENTO</i>	43
5.2.	Ensaio<i>s</i> <i>In Vitro</i> Para a Avaliação da Segurança e Eficácia	48
5.2.1.	<i>CITOTOXICIDADE IN VITRO</i>	48
5.2.2.	<i>ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS TRATADAS COM NLSM-ALFTCL-20</i>	50
6.	CONCLUSÃO	52
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

1. INTRODUÇÃO

1.1. Tratamentos Anticâncer

Atualmente, a combinação de remoção cirúrgica com quimioterapia ou radioterapia é a estratégia comumente indicada para o tratamento da maioria dos cânceres. No entanto, a taxa de morbidade associada a essas terapias é bastante significativa, principalmente devido à sua baixa seletividade para o tecido tumoral. A maioria dos medicamentos anticâncer utilizados nas quimioterapias convencionais possui ação inespecífica, com janela terapêutica muito estreita, comprometendo a qualidade de vida do paciente (ETHIRAJAN et al., 2011). Além disso, normalmente o tempo de meia vida destes fármacos é bastante curto, o que exige a administração dos fármacos por períodos mais longos. Assim, algumas estratégias são usadas para superar esses inconvenientes, entre elas, a nanomedicina, que utiliza sistemas carreadores na escala nanométrica para entrega dos fármacos; e a terapia fotodinâmica, que combina fármacos fotossensíveis e ativação com luz para gerar os efeitos tóxicos da terapia (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; HARE et al., 2017).

1.2. Nanotecnologia e Terapia Fotodinâmica

De acordo com a *International Organization for Standardization* (ISO), em sua especificação técnica ISO/TS 80004-1:2015, nanotecnologia é a aplicação de conhecimento científico para manipular e controlar (inclusive sintetizar) a matéria predominantemente em nanoescala (tamanho inferior a 1000 nm) para fazer uso de propriedades e fenômenos específicos e relacionados ao seu tamanho e estrutura, distintos daqueles associados a átomos ou moléculas individuais ou a tamanhos maiores do mesmo material.

Assim, nanomedicina pode ser entendida como o uso de materiais em nanoescala ou nanoestruturados na medicina que, de acordo com sua estrutura, têm efeitos médicos únicos, por exemplo, a capacidade de atravessar barreiras biológicas ou o direcionamento passivo dos tecidos (WAGNER et al., 2006).

Entre as potenciais vantagens da nanomedicina também podemos citar a capacidade de aumentar o tempo de meia vida de fármacos carregados por nanopartículas, o que pode reduzir a dose necessária. Além disso, as formas farmacêuticas produzidas por nanotecnologia também auxiliam na dispersão dos fármacos veiculados, o que auxilia no procedimento de administração dos mesmos.

Com relação à terapia fotodinâmica (TFD), podemos defini-la como uma terapia que envolve a administração de um agente fotossensibilizante no tumor, seguido pela ativação do agente pela luz de um comprimento de onda específico. Esta terapia resulta em uma sequência de processos fotoquímicos e fotobiológicos que promovem a geração de uma cascata de espécies reativas de oxigênio (EROs), que por sua vez vão gerar danos irreversíveis aos tecidos tumorais (DOUGHERTY et al., 1998).

A TFD envolve 3 componentes essenciais: fotossensibilizante (FS), luz e oxigênio. Sua ação decorre da excitação do FS pela luz, no comprimento de onda apropriado, ou seja, cada FS é ativado por um tipo de luz diferente, o que garante certa especificidade ao tratamento. O FS excitado então interage com o oxigênio molecular e essa reação termina na formação de EROs, que têm efeitos citotóxicos diretos e indiretos sobre as células tumorais. Nos efeitos diretos, as EROs causam indução da morte celular neoplásica por estresse oxidativo, ou seja, eliminação das células tumorais pelo excesso de radicais livres. Com

relação aos efeitos indiretos, as EROs geradas podem lesionar as células endoteliais que revestem os vasos sanguíneos, promovendo a formação de microtrombos e consequente obliteração da microvasculatura tumoral e consequente infarto tecidual local. Além disso, durante a morte celular, diferentes células de defesa são recrutadas no local e uma resposta imunológica contra estas células em estresse pode ser desenvolvida (AGOSTINIS et al., 2011).

A TFD tem sido uma opção atraente no tratamento de alguns tumores sólidos e outras doenças devido à sua abordagem terapêutica superior e menos invasiva, colaborando para uma toxicidade sistêmica mínima (HOPPER, 2000). Para tumores superficiais a TFD pode ser realizada em ambiente ambulatorial, o que reduz o tempo e custo de aplicação da terapia. Ademais, a principal vantagem da TFD sobre as terapias anticâncer convencionais é a capacidade de limitar efeitos tóxicos para os tecidos biológicos expostos ao FS e à luz, protegendo assim os tecidos normais (ZHANG et al., 2018). Nosso grupo de pesquisa tem experiência no desenvolvimento de nanocarreadores de fármacos fotossensibilizantes para o tratamento de diferentes tipos de tumores. Como background, já foram desenvolvidos ensaios pré-clínicos *in vitro* e *in vivo* utilizando esta modalidade terapêutica com bastante sucesso no tratamento destes modelos de estudo. Ademais, já foram realizados estudos clínicos envolvendo pacientes veterinários e humanos para o tratamento de tumores superficiais utilizando uma nanoemulsão lipídica contendo o fotossensibilizante cloreto de alumínio ftalocianina.

1.2.1. FOTOSSENSIBILIZANTES

Um fotossensibilizante ideal para TFD deve possuir as seguintes características: (1) fácil obtenção, levando-se em consideração custo e

viabilidade comercial, (2) forma química pura de composição conhecida, (3) solúvel e estável em meios fisiológicos ou formulações farmacologicamente aceitáveis, (4) alto coeficiente de excitação na janela fototerapêutica (650-850 nm – região do vermelho do espectro visível e infravermelho) e baixa absorção em 400-600 nm, (5) rendimento quântico inerentemente alto para a formação de EROs, especialmente as espécies fortemente oxidativas como oxigênio singlete, (6) toxicidade mínima na ausência de luz, (7) alta seletividade, acumulando-se preferencialmente nos tumores e não em tecidos saudáveis e (8) liberação rápida do corpo após o tratamento (O'CONNOR; GALLAGHER; BYRNE, 2009; LI et al., 2019).

A primeira geração de fotossensibilizantes é composta principalmente de porfirinas e seus derivados. Apesar de apresentarem uma longa história clínica de uso, possuem baixa seletividade ao tecido neoplásico, fraca absorção de luz na janela fototerapêutica e baixa eliminação do organismo. A segunda geração de fotossensibilizantes, por sua vez, foi desenvolvida para suprir as deficiências dos FS de primeira geração: possuem menor período de fotossensibilização, forte banda de absorção na região entre 650-850 nm, maior eficiência na produção de oxigênio singlete, além de melhor seletividade tumoral (ALLISON et al., 2010). A principal desvantagem do FS de segunda geração é sua baixa solubilidade em água, fator que limita significativamente a administração intravenosa e força a busca de novos métodos de carreamento (KWIATKOWSKI et al., 2018).

Entre os FSs de segunda geração, destacam-se as ftalocianinas (Ft), principalmente porque apresentam algumas características ideais para a TFD anticâncer, como absorção de luz entre 660 e 770 nm, alto rendimento quântico

para a geração de oxigênio singleto, acúmulo rápido e prolongado nas células cancerígenas, rápida eliminação do organismo e ótimas propriedades foto-físicas e foto-químicas quando comparadas a outros fotossensibilizantes. Além disso, suas estruturas químicas são facilmente modificadas através de introdução de metais centrais e axiais, periféricos e não periféricos substituintes (Índio, Zinco, Gálio e Alumínio, por exemplo). Contudo, a mesma característica que possibilita tantas vantagens é o maior limitante da aplicação das Fts em sistemas biológicos: apesar de o alto grau de hidrofobia das Fts auxiliar na sua retenção nos órgãos-alvo, a sua baixa solubilidade em meio fisiológico torna sua administração direta inviável devido a aglomeração de suas moléculas. A agregação de moléculas implica, ainda, na considerável redução de sua atividade fotodinâmica por meio do efeito de extinção (*quenching*, em inglês) (DURMUS, 2007; IDOWU; NYOKONG, 2007; LONGO et al., 2009; MUEHLMANN et al., 2014; GOTO; SIQUEIRA-MOURA; TEDESCO, 2017; ZHANG et al., 2018; LI et al., 2019).

A hidrofobicidade e a não seletividade dos FSs, a hipóxia grave inerente aos tecidos tumorais e a profundidade limitada da penetração da luz restringem as aplicações clínicas da TFD (LI; YAN, 2018). Desenvolveram-se, então, sistemas de administração de medicamentos, para uma TFD mais precisa (MUEHLMANN et al., 2014; VILLA NOVA et al., 2015; CALIXTO et al., 2016; MONGE-FUENTES et al., 2017; WANG et al., 2020). São os chamados fotossensibilizantes de terceira geração: FS de primeira e segunda geração conjugados a modificadores, como nanopartículas, por exemplo, que possibilitam uma entrega de fármacos mais eficaz, reduzindo, inclusive, a citotoxicidade contra células normais.

1.2.2. NANOCARREADORES

Conforme descrito anteriormente, a eficácia da TFD é dependente da produção de oxigênio singlete e do direcionamento seletivo, sem causar danos a tecidos saudáveis. Para atingir esse objetivo, os fotossensibilizantes foram modificados usando sistemas de nanocarreadores, como lipossomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas metálicas, nanopartículas lipídicas, etc.

Esses nanocarreadores permitem a superação de falhas associadas à TFD convencional, oferecendo uma maior razão superfície/volume, maior disponibilidade de FS no local de destino, coeficiente de extinção melhorado, além de possibilitar ajustes nas propriedades do FS (QIDWAI et al., 2020). Ademais, o espaço nanoscópico criado por estes carreadores permite que fármacos insolúveis se mantenham dispersos, fator que é fundamental para o desenvolvimento de todo o processo fotoquímico.

1.2.3. NANOPARTÍCULAS LIPÍDICAS SÓLIDAS

Entre os vários tipos de nanopartículas que podem ser associadas a FS para uso em terapia fotodinâmica anticâncer, destacam-se as nanopartículas lipídicas sólidas (NLSs).

As NLSs são partículas coloidais em escala nanométrica, constituídas por lipídios sólidos em temperatura ambiente, biocompatíveis e biodegradáveis, estabilizados por agentes tensoativos.

Sabe-se que as nanopartículas à base de lipídios são menos tóxicas e mais biocompatíveis em comparação com as nanopartículas inorgânicas ou poliméricas pois todos os seus componentes são completamente biodegradados pela maquinaria metabólica celular (H MULLER; SHEGOKAR; M KECK, 2011;

BAYÓN-CORDERO; ALKORTA; ARANA, 2019). Os NLSs possuem alta estabilidade, leve toxicidade, dispensam o uso de solventes orgânicos, admitem produção em escala industrial e permitem as mais diversas vias de administração (HU; TANG; CUI, 2004; BELOQUI et al., 2016; GHASEMIYEH; MOHAMMADI-SAMANI, 2018; FONSECA-SANTOS et al., 2019). Na Tabela 3 são apresentadas as principais vantagens e desvantagens da aplicação de NLSs como carreadores de fármacos.

Tabela 1 – Vantagens e desvantagens da aplicação de NLSs como carreadores de fármacos.

Características	Aspectos	Exemplos	Comentários/Perspectivas
Vantagens	Tecnológico	Proteção de drogas contra produtos químicos e degradação enzimática Estabilidade física Habilidade de incorporar drogas hidrofílicas e hidrofóbicas Produção pode ser escalonada Fácil fabricação Dispensa solventes orgânicos Habilidade de carregar dois agentes ativos (<i>co-delivery</i>) Alta eficiência de aprisionamento de drogas Possibilidade de esterilização Pequeno diâmetro e estreita distribuição	Amplo espectro de possíveis rotas de administração Aumento da estabilidade da droga na formulação Versatilidade na aplicação como carreador de drogas de diferentes grupos farmacológicos Possibilidade de produção industrial Possibilidade de fabricação em laboratório, baixo custo Sem preocupações com toxicidade, química verde Possibilidade de uma terapia mais eficiente (terapia combinada) Minimização da dose de formulação Adequada para administração parenteral Sistema atraente para entrega de drogas
Vantagens	Biológico	Diferentes vias de administração Biodegradável	Maior espectro de aplicação de drogas, possibilidade de melhor seleção de terapia Possibilidade de aplicação como matriz para liberação sustentada de fármaco

Características	Aspectos	Exemplos	Comentários/Perspectivas
		Liberação de droga controlada	Segurança para os pacientes, possibilidade de liberação prolongada do medicamento, pode ser fornecida uma concentração terapêutica do medicamento no plasma
		Direcionamento específico ao alvo	Diminuição da toxicidade sistêmica, terapia direcionada
		Biocompatibilidade	Evita reações alergênicas
		Aumento da biodisponibilidade do medicamento incorporado	Minimização da dose
		Minimização de efeitos colaterais de drogas tóxicas	Aumento da segurança do paciente
		Cruzamento eficiente de barreiras biológicas	Possibilidade de várias vias de administração
		Redução da frequência de dosagem	Adesão dos pacientes
Desvantagens	Tecnológico	Expulsão de drogas após transição polimórfica durante o armazenamento	Problemas de estabilidade durante o armazenamento e a administração, limitação para produção industrial
		Baixa capacidade de carga de drogas	Necessárias altas doses da formulação
		Polidispersão	Inapropriado para administração intravenosa
		Aglomeração	Problemas no armazenamento
		Armazenamento em condições refrigeradas	Problemas no transporte, aumento no custo de armazenamento
		Alta temperatura de formulação	Problema com drogas termolábeis
Desvantagens	Biológico	Efeito <i>burst</i> inicial da droga incorporada	Risco de overdose no paciente
		Tempo de circulação relativamente baixo	Reconhecimento rápido pelo sistema reticuloendotelial antes de atingir o tecido alvo

Nota. Fonte: (GESZKE-MORITZ; MORITZ, 2016)

As manteigas obtidas a partir de sementes de plantas têm se destacado como produtos promissores para o desenvolvimento de nanopartículas lipídicas sólidas. Portanto, o mapeamento sistemático em torno do desenvolvimento tecnológico de nanoestruturas produzidas a partir de manteigas derivadas de plantas é potencialmente valioso para pesquisadores interessados em novas

formulações alternativas para terapia farmacológica, com potenciais impactos industriais, econômicos, de saúde e sociais (COELHO et al., 2020). Algumas manteigas vegetais, como a manteiga de murumuru (*Astrocaryum murumuru*), são praticamente inexploradas na produção de nanopartículas lipídicas, contudo podem ser consideradas promissoras, devido a suas composições particulares (GOMES et al., 2019).

Além disso, a identificação de propriedades farmacológicas destas fontes naturais de manteigas tem grande potencial de impacto na agregação de valor a estes produtos. Em termos de bioeconomia, cadeias produtivas longas podem ser geradas a partir da identificação destas potenciais propriedades.

1.2.4. MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE NLSs

Pode-se classificar os métodos de produção de NLSs em dois grandes grupos: processos de alta energia (ou de caráter *top-down*) e processos de baixa energia (de caráter *bottom-up*) (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Processos de alta energia usam dispositivos mecânicos especialmente projetados (homogeneizadores) que geram altos níveis de energia, capazes de quebrar as partículas em tamanhos menores. Em contrapartida, abordagens de baixa energia induzem os sistemas à auto-agregação (*self-assembly*) por meio da manipulação adequada das propriedades físico-químicas do sistema. Especial atenção tem sido dada tais processos, pois constituem metodologias capazes de prevenir a degradação das moléculas encapsuladas, além de serem interessantes no que se refere a escalonamento, já que são relativamente simples e apresentam um baixo consumo energético (ANTON; BENOIT; SAULNIER, 2008).

Nos métodos de baixa energia, o fator-chave é o cruzamento da curva de transição de emulsões lipídio em água (L / A) em emulsões água em lipídio (A / L), denominada inversão de fase transicional, que ocorre devido a mudanças na formulação (alterações de parâmetros físico-químicos no tensoativo, na fase aquosa ou na fase lipídica), as quais podem alterar a afinidade hidrofílica ou lipofílica do tensoativo (MORAIS; ROCHA-FILHO; BURGESS, 2009).

O tipo de inversão de fase transicional mais comum é a inversão de fase por temperatura (PIT – do inglês – *phase inversion temperature*). Esse método se dá a partir da alteração espontânea da curvatura de tensoativos não iônicos, o que acontece com a mudança de temperatura do sistema (Figura 2). Sistemas L / A em baixas temperaturas, são forçadas a se transformar em sistemas A / L em temperaturas mais altas e vice-versa. Durante o resfriamento, o sistema cruza um ponto de tensão superficial mínima, promovendo a formação de gotículas de óleo finamente dispersas (MEI et al., 2011). Ou seja, no método de preparação PIT, o uso de um tensoativo não iônico leva a uma inversão de uma macroemulsão L / A para uma emulsão A / L durante o aumento de temperatura, para, finalmente formar uma nanoemulsão L / A durante o resfriamento (CORRIAS; LAI, 2011).

O conceito de PIT refere-se à temperatura ou intervalo de temperaturas nas quais as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um tensoativo não-iônico estão em equilíbrio. Assim, o tensoativo pode modificar sua afinidade por água e lipídio em função da temperatura (SCHALBART; KAWAJI; FUMOTO, 2010).

O método PIT tira proveito das tensões superficiais extremamente baixas no ponto de temperatura de equilíbrio hidrofílico-lipofílico para promover sistemas nos quais pode-se obter tamanhos de gotas muito pequenos. No entanto, as emulsões são muito instáveis: se a temperatura do sistema é rapidamente afastada da temperatura PIT por um rápido resfriamento ou aquecimento, podem ser produzidos sistemas cineticamente estável L / A ou A / L, respectivamente (Figura 3). Durante este processo de resfriamento rápido, moléculas do tensoativo migram rapidamente da fase lipídica para a fase aquosa, resultando na formação espontânea de pequenas gotas de lipídio devido ao aumento na área superficial e ao fluxo turbulento gerado (Figura 2-A).

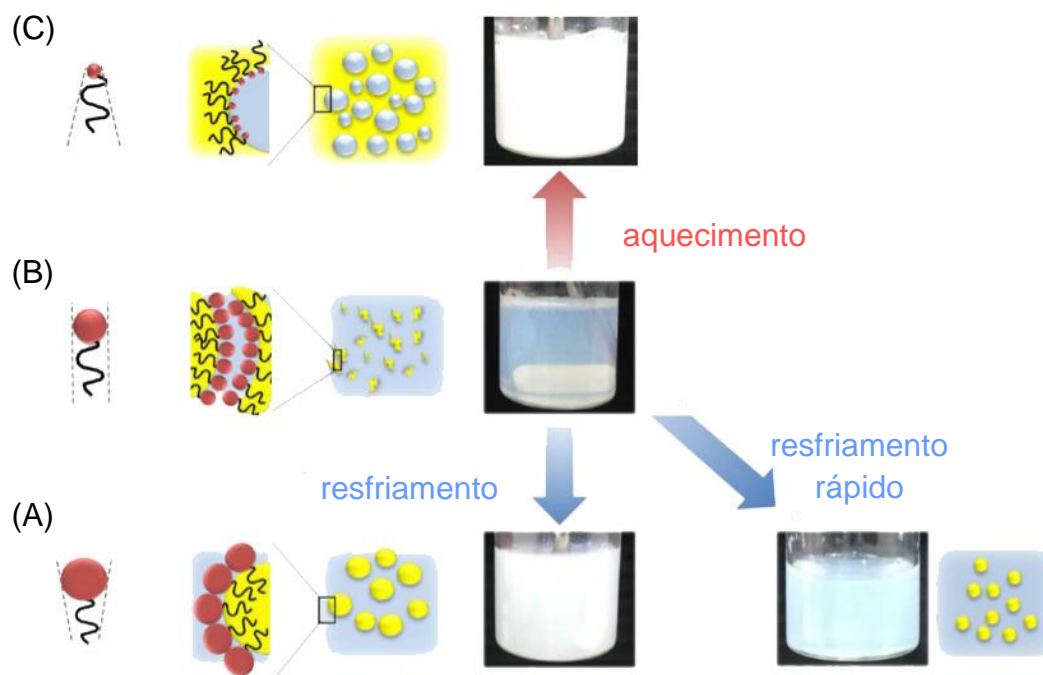


Figura 1 – Representação esquemática do método PIT. Em temperatura relativamente baixa (A), os grupos da cabeça do tensoativo são altamente hidratados, o que favorece a formação de sistemas L / A. Com o aumento da temperatura, atinge-se um ponto crítico denominado temperatura de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (B). Neste ponto, a solubilidade do tensoativo nas fases lipídicas e aquosas é aproximadamente igual, as tensões superficiais são extremamente baixas e o sistema aparece translúcido. Em alta temperatura (C), a cabeça polar do tensoativo encontra-se altamente desidratada, o que favorece a formação de sistemas A / L (Adaptado de JINTAPATTANAKIT, 2018).

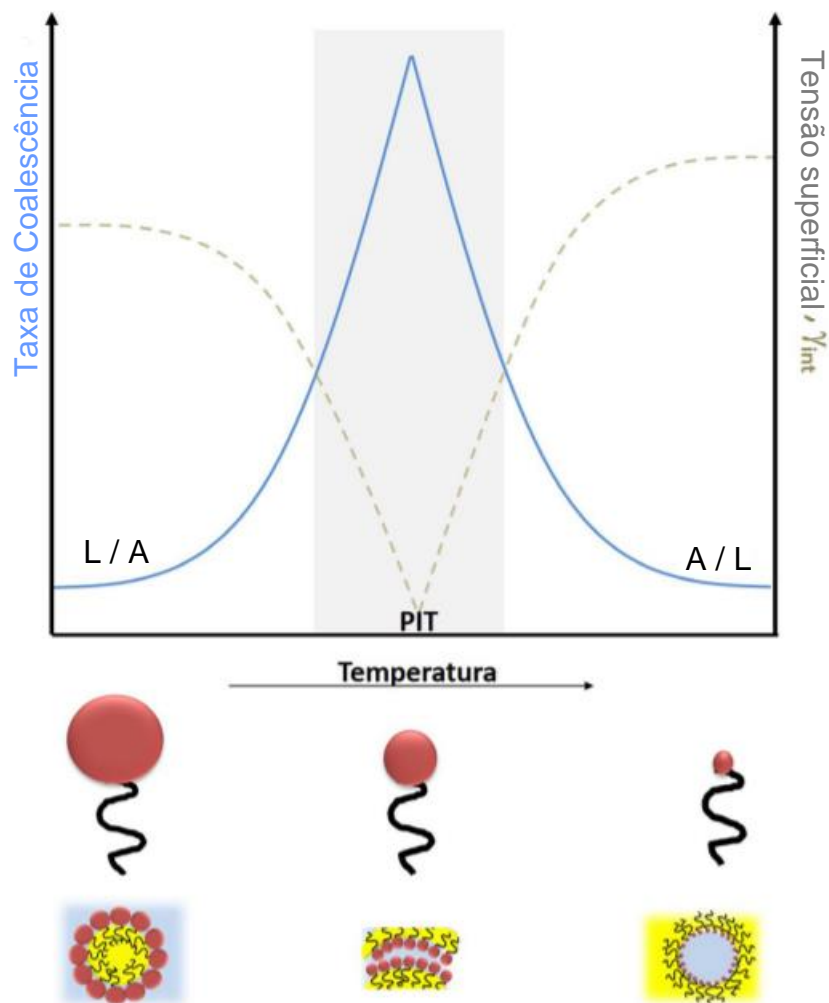


Figura 2 – Representação esquemática da relação entre temperatura, taxa de coalescência e tensão superficial na formação de nanossistemas pelo método PIT (Adaptado de JINTAPATTANAKIT, 2018).

1.2.4.1. Agentes Estabilizantes Utilizados na Síntese de NLSs

Na síntese de NLSs, agentes estabilizantes, denominados tensoativos, são capazes de reduzir a energia entre a fase lipídica e a fase aquosa durante a preparação das partículas, graças à sua tendência de se acumularem na interface, formando uma camada em torno das partículas, que favorece a estabilidade física da dispersão durante o armazenamento (GORDILLO- GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018).

Os tensoativos como agentes estabilizadores/solubilizantes em formulações farmacêuticas melhoram a atividade biológica e também controlam o perfil de liberação do fármaco para diferentes fins terapêuticos. Alguns pesquisadores relataram que o agente estabilizador influencia a estrutura cristalina das partículas e determina, entre outros, seu comportamento eletrocínético (HELGASON et al., 2009).

Os tensoativos não iônicos são amplamente utilizados para formar nanossistemas devido à sua baixa toxicidade, ausência de irritabilidade e capacidade de formar nanoemulsões facilmente por processos de alta e baixa energia (MCCLEMENTS; RAO, 2011).

1.3. Bioeconomia, Química Verde e Sociobiodiversidade

Com 6 milhões de km², a Amazônia é a maior floresta tropical do mundo e abriga cerca de 16.000 espécies de árvores, o que a torna rica em recursos genéticos de frutas e plantas oleaginosas, cuja exploração comercial é potencialmente muito importante (TER STEEGE et al., 2013; PIMM et al., 2014; SKIRYCH et al., 2016; SERRA et al., 2019).

O uso desses recursos, com base no atual discurso global e influente da bioeconomia, que enfoca o papel da pesquisa e desenvolvimento relacionados às matérias-primas biológicas, bem como o estabelecimento de novas cadeias de valor, pode causar mudanças institucionais na sociedade que trabalha e depende desses insumos, sem negligenciar a preocupação ecológica com o desenvolvimento sustentável (PÜLZL; KLEINSCHMIT; ARTS, 2014; BUGGE; HANSEN; KLITKOU, 2016).

A busca pela eficiência combinada à responsabilidade ambiental encontra outro importante conceito atual, a Química Verde, que oferece benefícios

econômicos e ambientais ao processo, reduzindo as consequências indesejadas, utilizando reagentes comuns ou naturais na composição de um determinado produto (TUCKER, 2006).

No Brasil, o Plano Nacional para a Promoção das Cadeias de Produtos da Sociobiodiversidade (2009) propõe linhas de ação, fontes de recursos e um sistema de gestão compartilhada e descentralizado, visando o fortalecimento das cadeias produtivas e a consolidação de mercados sustentáveis para os produtos e serviços da sociobiodiversidade (produtos finais, matérias primas ou benefícios gerados a partir de recursos da biodiversidade, voltados à formação de cadeias produtivas de interesse dos povos e comunidades tradicionais e de agricultores familiares, que promovam a manutenção e valorização de suas práticas e saberes, e assegurem os direitos decorrentes, gerando renda e promovendo a melhoria de sua qualidade de vida e do ambiente em que vivem).

1.3.1. MANTEIGA DE MURUMURU

As plantas oleaginosas são recursos de grande interesse com uma ampla gama de aplicações em potencial nos campos nutricional, agrícola, cosmético e farmacêutico, devido ao amplo espectro de atividades biológicas como atividade antimicrobiana, repelente, analgésica, anti-inflamatória e muitas outras (DE MATOS et al., 2019).

Um exemplo de uma planta oleaginosa da Amazônia é o murumuru (*Astrocaryum murumuru*), espécie perene, ocorrente no Amapá e em todo o estuário do rio Amazonas especialmente em áreas úmidas e alagadas e próximas a rios e lagos.



Figura 3 – Cocos de murumuru (Adaptado de SOS AMAZÔNIA, 2018).

Sua palmeira mede entre 3 e 6 metros de altura e pode produzir até 300 frutos (MAMBRIN; BARRERA ARELLANO, 1997). Um pé de murumuru produz cerca de 11kg de caroço seco e, através de extração hidráulica, o rendimento de óleo pode chegar até 35% do peso seco da amêndoa, equivalendo a cerca de 3,8 litros por pé (MORAIS, 2009).

Tabela 2 – Dados físico-químicos da manteiga de murumuru

Característica	Unidade	Apresentação
Aparência	---	Manteiga sólida
Cor	---	Branco a amarelado
Odor	---	Característico
Índice de iodo	g I ₂ /100g	10 – 15
Índice de saponificação	mgKOH/g	230 – 240
Densidade	25°C g/ml	0,9325
Ponto de fusão	C°	30 – 35

Nota. Fonte: (MORAIS, 2009; PESCE, 2009)

Os óleos extraídos das amêndoas de murumuru tornam-se uma gordura semi-sólida (manteiga) em temperatura ambiente, que contém cerca de 40% de

ácido láurico, conhecido por suas atividades antifúngicas, bactericidas, virucidas e até anticâncer (LIEBERMAN; ENIG; PREUSS, 2006; LAPPANO et al., 2017).

Tabela 3 – Composição dos ácidos graxos do murumuru

Ácidos graxos	Unidade	Apresentação
Caprílico (C 6:0)	% massa	2 a 4
Cáprico (C 8:0)	% massa	1 a 3
Láurico (C 12:0)	% massa	40 a 50
Mirístico (C 14:0)	% massa	28 a 33
Palmítico (C 16:0)	% massa	5 a 10
Esteárico (C 18:0)	% massa	2 a 5
Oleico (C 18:1 – Omega 9)	% massa	5 a 10
Linoleico (C 18:2 – Omega 6)	% massa	1 a 5
Saturado	%	90
Insaturado	%	10

Nota. Fonte: (MORAIS, 2009; PESCE, 2009)

2. JUSTIFICATIVA

Assim, com base nos conceitos de bioeconomia e química verde e combinando os excelentes resultados obtidos pela nanomedicina e terapia fotodinâmica contra o câncer, este trabalho visa desenvolver uma nanopartícula lipídica sólida, utilizando em sua composição a manteiga de murumuru, combinada com o fotossensibilizador cloreto de alumínio-ftalocianina (AlFtCl).

Espera-se poder contribuir no desenvolvimento de novas formulações para serem utilizadas como transportadores mais eficientes de fármacos, entre outras possibilidades, além de apresentar uma alternativa sustentável e menos tóxica aplicada à terapia fotodinâmica anticâncer.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Desenvolver, dentro do contexto da nanotecnologia verde, formulações contendo cloreto de alumínio-ftalocianina encapsuladas em nanopartículas

lipídicas sólidas com potencial para serem utilizadas como alternativas sustentáveis e menos tóxicas em terapias anticâncer atuais.

3.2. Objetivos Específicos

- Desenvolver nanopartículas lipídicas sólidas cuja matriz lipídica seja composta por manteigas naturais da Amazônia – especificamente, murumuru (*A. murumuru*) – doravante denominadas NLSM, com diâmetro hidrodinâmico menor que 100 nm, útil ao direcionamento passivo a tumores;
- Associar, às nanopartículas criadas, o cloreto de alumínio-ftalocianina (NLSM-AIFtCl), de maneira a manter a sua atividade fotodinâmica em meio aquoso;
- Avaliar as características coloidais (potencial zeta, diâmetro hidrodinâmico e índice de polidispersão) das NLSM-AIFtCl;
- Avaliar as propriedades foto-físicas (espectros de fluorescência e absorbância) e físico-químicas (avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio – EROs), das NLSM-AIFtCl;
- Realizar experimentos biológicos *in vitro* a fim de analisar a segurança e a eficácia das NLSM-AIFtCl. Neste estudo, foram utilizadas células de melanoma murino B16F10.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

4.1.1. PREPARO DA NLS CONTENDO FOTOSSENSIBILIZANTE

As NLSMs contendo cloreto de alumínio-ftalocianina (NLSM-AIFtCl) foram preparadas utilizando-se o AIFtCl como FS, Brij® O10 como tensoativo e manteiga de murumuru (Amazon Oil Industry, Brasil) como solubilizante do FS.

Inicialmente, para formulação da NLSM sem o fármaco, foram colocados, em um béquer, sob agitação (300 RPM), 1g de manteiga de murumuru e 2 g de Brij® O10 (proporção 1:2) com temperatura de 50 °C por 10 minutos, até formar uma mistura homogênea. Em seguida, 40 mL de água destilada, previamente aquecida a 75 °C, eram adicionados e mantidos sob agitação até que a temperatura do sistema (doravante, neste trabalho, denominada temperatura PIT) atingisse 75 °C. De imediato, então, o sistema era transferido para um béquer resfriado e mantido sob agitação até atingir 25 °C, valor considerado ótimo em diversos estudos (IZQUIERDO et al., 2004, 2005; GAO; MCCLEMENTS, 2016).

Foram testadas diferentes quantidades de água destilada (20 mL, 30 mL, 40 mL e 50 mL); diferentes temperaturas PIT (70 °C, 75 °C, 80 °C, 85 °C e 90 °C); e diferentes proporções de matrizes lipídicas:tensoativos (1:2, 1:1, 2:1 e 3:1 m/m).

Em seguida, foram realizados testes de avaliação das propriedades coloidais das NLSMs obtidas e, após definição dos melhores parâmetros, deu-se prosseguimento aos testes com o FS.

A princípio, as NLSM-AIFtCl foram preparadas baseadas no método descrito por Muehlmann et al. (2015) e Rodrigues et al. (2020): em um béquer foram dispostos o tensoativo Brij O 10® (1 g) e a manteiga de murumuru (2 g),

mantidos sob agitação (300 RPM) com temperatura de 50 °C por 10 minutos, a fim de formar uma mistura homogênea. Em seguida, foi adicionado AIFtCl (0,0023 g) solubilizado em 4 mL de etanol, sendo mantidos os parâmetros de agitação e temperatura por mais 30 minutos para evaporação do solvente. Então, 10 mL de água destilada a 75°C foram adicionados ao sistema e temperatura do agitador foi elevada para 85 °C. Aguardou-se o sistema atingir a temperatura PIT de 80 °C e, imediatamente, foi feito o resfriamento rápido, ainda sob agitação, até que o sistema atingisse a temperatura de 25 °C. A concentração final dessa NLSM-AIFtCl foi de 40 µM. A partir desse método, foram formuladas NLSM-AIFtCl com diferentes concentrações finais de AIFtCl (20 µM, 40 µM, 60 µM e 80 µM).

Por fim, foram realizados novos testes de avaliação das propriedades coloidais, além da avaliação das propriedades foto-físicas e físico-químicas das NLSM-AIFtCl, com o intuito de determinar qual nanossistema reunia as características mais vantajosas.

4.1.2. CARACTERIZAÇÃO E ESTABILIDADE DA NLS

4.1.2.1. Propriedades Coloidais

O diâmetro hidrodinâmico (DH), o potencial zeta (PZ) e o índice de polidispersão (IPD) das NLSs foram avaliados por dispersão de luz dinâmica e dispersão de luz eletroforética, respectivamente. As amostras foram diluídas a uma proporção de 1:10 (m/v) em água destilada e todos os parâmetros foram analisados com o auxílio do equipamento Zetasizer (ZS90, Malvern).

O DH determina o tamanho das partículas. Partículas menores tendem a possuir maior versatilidade, no que se refere a vias de administração do fármaco, e maior eficácia, em se tratando de penetração nas células.

Já o IPD fornece informações sobre a homogeneidade da distribuição dos tamanhos das nanopartículas, valores baixos de IPD ($IPD \leq 0,2$) estão relacionados a sistemas monodispersos, mais estáveis, enquanto valores de $IPD \geq 0,4$ indicam uma distribuição polidispersa e com menor estabilidade.

4.1.2.2. Propriedades Foto-físicas

Os espectros de fluorescência e absorbância na região visível do espectro eletromagnético foram traçados para NLSM e NLSM-AIFtCl, utilizando-se 200 μ L de cada solução, dissolvidos em água destilada, em microplacas de 96 poços, transparentes (para absorbância) ou negros opacos (para fluorescência). A absorbância foi medida entre os comprimentos de onda de luz (λ) de 350 e 750 nm, com resolução de 1 nm. A fluorescência foi mensurada sob excitação com λ de 400 nm e emissão entre λ de 350 e 750 nm, com resolução de 1 nm. Todas as medidas foram realizadas sob temperatura de 25 °C em espectrofotômetro leitor de microplacas (SpectraMax M2®, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Os resultados foram expressos como unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.).

4.1.2.3. Propriedades Físico-Químicas (Avaliação da Produção de Espécies Reativas de Oxigênio)

Para avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), foi utilizado o seguinte método (SPILLER et al., 1998; MUEHLMANN et al., 2015): 100 μ L de cada uma das NLSM foram colocados em poços de uma microplaca de 96 poços e imediatamente lida a absorção (410 nm) com auxílio de um espectrofotômetro com leitora de placas. Em seguida, adicionaram-se 10 μ L da solução do reagente 1,3-difenil-isobenzofurano (DBF) às nanoformulações de

cada poço e feita uma nova leitura (produção de EROs 0%). O DBF é um reagente químico sensível a presença de EROs que possui pico de absorção de luz em torno de 410nm. Por ser atacado pelas espécies reativas geradas no processo fotodinâmico, este reagente é degradado à medida que estas espécies são geradas. Em termos metodológicos, observamos a extinção do DBF pela redução do pico de absorbância típico em 410 nm.

As NLSM-AIFtCl com DBF foram então irradiadas com densidades de energia luminosa variando de 0,5 a 10,0 J/cm². Esse procedimento se repetiu até que houvesse a estabilização da absorbância das amostras (nível máximo de produção de EROs). Os resultados foram expressos como porcentagem de produção de EROs em função da densidade energética.

4.1.2.4. Estabilidade sob Armazenamento

Após a avaliação das propriedades coloidais, foto-físicas e físico-químicas das NLSM-AIFtCl foram selecionadas as formulações mais vantajosas para testes de estabilidade de armazenamento. Os testes foram realizados por 60 dias em três condições diferentes: a $37 \pm 0,5$ °C; a temperatura ambiente (TA – aproximadamente 25 °C); e a 4 ± 1 °C. Para averiguar a estabilidade dos nanossistemas desenvolvidos, foram considerados os parâmetros DH, IPD e PZ. As amostras foram preparadas para análise conforme mencionado no item 4.2.2.1.

4.2. Ensaio *In Vitro* para a Avaliação da Segurança e Eficácia

4.2.1. CULTIVO CELULAR

Linhagens celulares de melanoma murino (B16F10) foram mantidas em meio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) estéril e

suplementado com soro fetal bovino 10% (v:v) e antibiótico (1 UI/mL penicilina e 1 µg/mL streptomicina), pH 7,4. As células foram conservadas em incubadora a 37°C, em atmosfera umidificada contendo 5% de CO₂.

4.2.2. DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

Células B16F10 foram semeadas em concentração de 5×10^3 células/poço em placas de 96 poços. Após 24 horas foi realizada diluição seriada 1:2 das NLSM (com concentrações iniciais 20 µM e 40 µM de AlFtCl e sem AlFtCl) em meio de cultivo DMEM suplementado. Após 15 minutos de exposição à formulação, o sobrenadante foi retirado das células e estas foram lavadas 2 vezes com PBS e acrescentado o meio de cultivo DMEM.

Posteriormente, as células foram expostas ao LED (660 nm, 25.88 J/cm²) para aplicação da TFD durante 10 minutos. Após o tratamento (24h), para determinação do índice de citotoxicidade, as células foram expostas à solução de brometo de 3 (4,5 dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil-tetrazólio (MTT) em meio de cultivo, método de avaliação colorimétrica descrito por Mosmann (1983). Neste método, o MTT é utilizado como substrato de enzimas mitocondriais, que tem como produto a formação de cristais de formazan. Nesse sentido, a quantificação dos cristais de formazan é um indicativo da atividade mitocondrial das células viáveis. Para finalizar o experimento, a solução contendo MTT foi removida após duas horas e 200 µL de dimetilsulfóxido (ou sulfóxido de dimetilo – DMSO) foram adicionados para a extração e solubilização dos cristais de formazan, posteriormente quantificado em termos de absorbância em comprimento de onda específico (595 nm).

A partir da medida do espectro de absorbância com comprimento de onda de 595 nm, obtido em espectrofotômetro conjugado à leitora de microplacas, a

produção de formazan foi quantificada e, portanto, determinada a viabilidade celular, conseqüentemente pode-se determinar o índice de citotoxicidade de 50% (IC50).

4.2.3. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS TRATADAS

Para avaliar a atividade das NLSM nas células, 5×10^4 de células B16F10 foram semeadas em placas de cultivo de 24 poços contendo lamínulas. Após 24 horas as células foram tratadas com os seguintes grupos: 1) IC50 com TFD; 2) IC50 sem TFD, 3) MTX (Mitoxantrona) e 4) Controle (meio de cultivo).

A mitoxantrona (MTX) é um quimioterápico utilizado como controle positivo para apoptose (GARG; AGOSTINIS, 2014). Para a realização do experimento, a MTX foi dissolvida em DMSO na concentração final de $40\mu\text{M}$. As células foram expostas à MTX durante 30 minutos e foram lavadas 2 vezes com PBS e meio novo foi colocado. Para os tratamentos com a NLSM, as células foram expostas por 15 minutos e, em seguida, o sobrenadante foi retirado das células e estas foram lavadas 2 vezes com PBS e acrescentado o meio de cultivo DMEM. Posteriormente, um dos grupos de células foi exposto ao LED (660nm , 25.88 J/cm^2) para aplicação da TFD durante 10 minutos.

Após o tratamento, todos os grupos foram lavados 2 vezes com PBS para retirada do excesso de meio de cultivo. As lamínulas foram imersas em acetona de 10%, 30%, 50%, 70% e 100% para tirar toda a água e depois recobertas com ouro para serem analisadas no microscópio eletrônico de varredura (MEV) nos aumentos 300-2700x, possibilitando a análise da morfologia e indução de apoptose.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Desenvolvimento das Nanopartículas Lipídicas Sólidas

5.1.1. PROPRIEDADES COLOIDAIAS

Conforme exposto no item 4.2.1, diversas variáveis foram testadas a fim de se obter uma NLS sustentável e menos tóxica, à base de manteiga de murumuru e estabilizada pelo tensoativo Brij® O10, com as melhores propriedades coloidais.

Buscando reduzir o uso de tensoativo e consequentemente o potencial de toxicidade do sistema formado, proporções distintas de lipídio:tensoativo foram testadas. Os resultados do primeiro parâmetro avaliado estão representados na Figura 4.

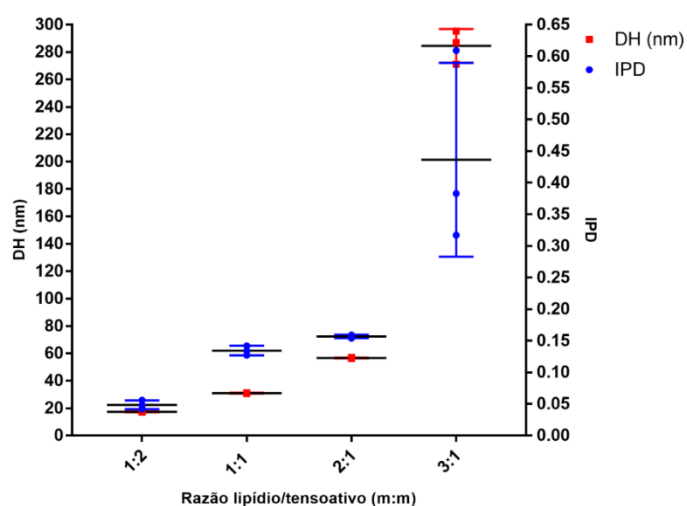


Figura 4 – Análise das propriedades coloidais das NLSM obtidas com a variação na razão lipídio/tensoativo. Fica evidente que há uma tendência de o aumento de lipídios no sistema promover aumento de DH e IPD. Os quadrados em vermelho representam os dados de DH, e os círculos azuis representam os dados referentes ao IPD. Os dados estão representados como média e desvio padrão da média.

Observou-se que as proporções lipídio:tensoativo 1:2, 1:1 e 2:1 (m/m) apresentaram resultados satisfatórios, dentro do proposto neste trabalho, com DHs médios menores que 100 nm (17,36 nm; 30,96 nm; e 56,63 nm,

respectivamente) e monodispersas, com IPDs médios < 0.2 (0.048; 0.134; e 0.156, respectivamente). A exceção coube à NLSM que apresentava a proporção lipídio:tensoativo 3:1, com DH médio = 284,50 nm e IPD médio = 0.436, possivelmente devido ao fenômeno de agregação – processo irreversível de adesão inter-particular que leva a formação de aglomerados grandes e irregulares, ocasionando instabilidade das partículas (MOORE et al., 2015).

A correlação positiva entre a razão lipídio/tensoativo e IPD representa o fato já bem estabelecido pela literatura de que há concentração de tensoativo ideal para a formação de estruturas. Enquanto altas concentrações podem atingir a Concentração Micelar Crítica (CMC) e formar micelas de tensoativos e, conseqüentemente, diferentes populações no sistema, baixas concentrações de tensoativo promovem formação de poucas estruturas e/ou gera estruturas de baixa estabilidade (VAN ELK et al., 2016).

O segundo parâmetro testado foi a quantidade de água adicionada à mistura lipídio/tensoativo. O resultado das análises das propriedades coloidais das NLSMs resultantes das formulações com 20 mL, 30 mL, 40 mL e 50 mL de água destilada está expresso na Figura 5.

A NLSM produzida com 40 mL de água destilada apresentou DH médio de aproximadamente 56 nm, portanto dentro do estabelecido como objetivo do trabalho (partículas menores que 100 nm) e IPD médio de 0.156, o que indica uma distribuição homogênea e uniforme das nanopartículas. Verificou-se que tanto o acréscimo quanto a redução da quantidade de água destilada adicionada à formulação resultaram num aumento do DH e do IPD.

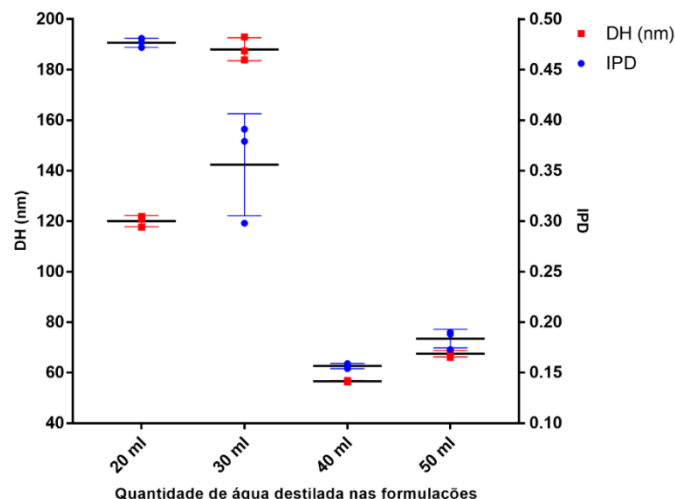


Figura 5 – Avaliação do DH e do IPD nas NLSM formuladas com diferentes quantidades de água destilada. Os quadrados em vermelho representam os dados de DH, e os círculos azuis representam os dados referentes IPD. Os dados estão representados como média e desvio padrão da média.

Por fim, foi avaliada a temperatura de inversão de fase ideal para o sistema. Primeiramente, a inversão de fase foi observada visualmente, através da mudança na viscosidade e transparência (MORALES et al., 2003). A avaliação visual, apesar de empírica, permitiu verificar mudanças significativas no aspecto das formulações, à medida que a temperatura aumentava: um aumento da translucidez foi verificado até 80 °C e, a partir de 85 °C, notou-se turbidez e separação de fases.

Os resultados obtidos na análise das propriedades coloidais das formulações (Figura 6) corroboram os achados aparentes, demonstrando uma redução do DH e do IPD até a temperatura de 80 °C (DH médio = 33,31 nm e IPD médio = 0.096), seguida do aumento dessas características a partir dessa temperatura. Dessa forma, concluiu-se que a temperatura PIT ideal se encontrava próxima dos 80 °C.

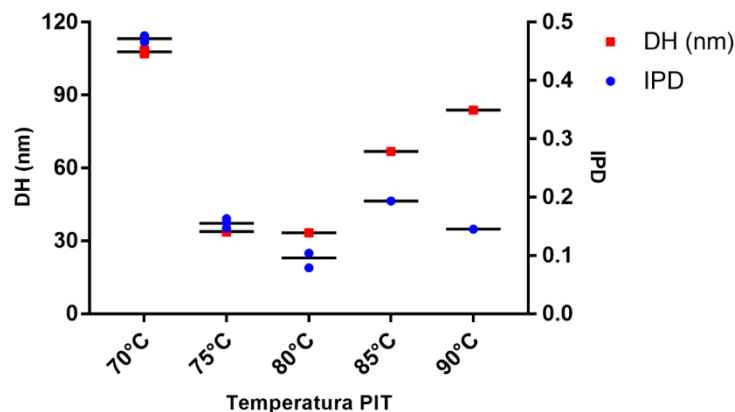


Figura 6 – Relação temperatura/DH/IPD. Os menores valores de DH e IPD foram verificados nas formulações com temperatura PIT próxima a 80 °C. Os quadrados em vermelho representam os dados de DH, e os círculos azuis representam os dados referentes ao IPD. Os dados estão representados como média e desvio padrão da média.

Com base no exposto nos parágrafos anteriores, selecionou-se a NLS formulada com manteiga de murumuru e Brij® O10 na proporção 2:1, com características coloidais notáveis, que viabilizam a utilização de tensoativo de forma moderada, resultando em uma potencial redução de toxicidade. A essa mistura, resumidamente e conforme descrito no item 4.2.1, foram adicionados diferentes volumes de AIFtCl, seguidos de 40 mL de água destilada até que fosse atingida a temperatura PIT de 80 °C, a fim de se obter NLSM-AIFtCl com diferentes concentrações finais (20 µM, 40 µM, 60 µM e 80 µM). Por fim, foi feita a avaliação do DH e do IPD das formulações resultantes, exposta na Figura 7.

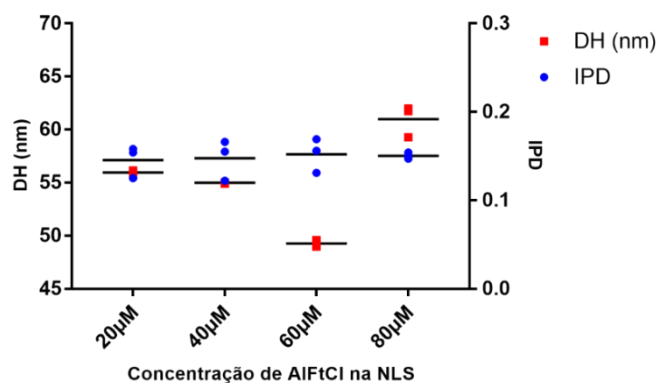


Figura 7 – A variação da concentração de AIFtCl nas NLSM-AIFtCl não resultou em diferenças significantes no tamanho médio das partículas e nem na média de polidispersividade.

O potencial zeta (PZ) das NLSM-AIFtCl também foi medido a fim de antecipar a estabilidade das formulações. A medição do PZ é uma técnica para determinar a carga superficial de nanopartículas em uma solução coloidal: coloides de elevado potencial zeta (negativo ou positivo) são eletricamente estáveis enquanto coloides com baixos potenciais zeta tendem a coagular ou flocular como descrito na Tabela 4 (KUMAR; DIXIT, 2017).

Tabela 4 – Comportamento de estabilidade do coloide com base no valor do potencial zeta.

Potencial Zeta [mV]	Comportamento de Estabilidade do Coloide
de 0 a ± 5	coagulação rápida ou floculação
de ± 10 para $30 \pm$	instabilidade incipiente
de ± 30 para $40 \pm$	estabilidade moderada
de ± 40 para $60 \pm$	boa estabilidade
mais do que ± 61	excelente estabilidade

Nota. Fonte: (KUMAR; DIXIT, 2017)

Os resultados obtidos (Figura 8) revelam nanopartículas com PZ negativo, o que é uma característica interessante, visto que partículas com carga negativa possuem maior tempo de circulação, uma vez que possuem reduzida adsorção de proteínas plasmáticas e baixa taxa de captação celular inespecífica (ALEXIS et al., 2008). Contudo, os baixos valores de PZ não sinalizam uma estabilidade teoricamente considerada excelente.

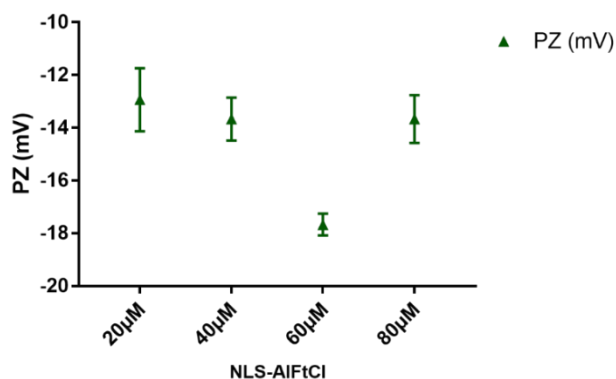


Figura 8 – A variação da concentração de AIFtCl nas NLSM-AIFtCl não resultou em diferenças significantes no potencial zeta das formulações.

Dessa forma, entre as variáveis testadas para obtenção de uma NLS sustentável e menos tóxica, à base de manteiga de murumuru e estabilizada pelo tensoativo Brij® O10, as melhores formulações foram obtidas utilizando-se a razão lipídio:tensoativo 2:1 (m:m), com características coloidais notáveis, que viabilizam a utilização de tensoativo de forma moderada, resultando em uma potencial redução de toxicidade.

As formulações que apresentaram as propriedades coloidais mais vantajosas foram aquelas às quais foram adicionados 40 mL de água destilada e que atingiram a temperatura PIT de 80 °C, resultando em nanossistemas com DH médio de 56 nm e IPD médio de 0.156. Essas características revelam partículas monodispersas e de diâmetro útil para diversas vias de administração.

5.1.2. PROPRIEDADES FOTO-FÍSICAS

Os espectros de absorvância e de emissão de fluorescência foram medidos na NLSM e nas NLSM-AIFtCl obtidas (Figuras 9 e 10). Verificou-se que as NLSM-AIFtCl contendo concentrações finais de AIFtCl de 20 µM e 40 µM (NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40, respectivamente) apresentaram picos de absorvância próximos a 680 nm (676 nm e 674 nm, respectivamente). Esta é uma característica importante a ser considerada na avaliação da sua utilização em TFD anticâncer já que a janela terapêutica ideal para TFD está na região espectral entre 600 - 800 nm, em que a penetração da radiação nos tecidos vivos é maior e a absorção por cromóforos endógenos (água, proteínas, pigmentos como a melanina e a bilirrubina) é menor (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; CONTE et al., 2016; SORTINO, 2016).

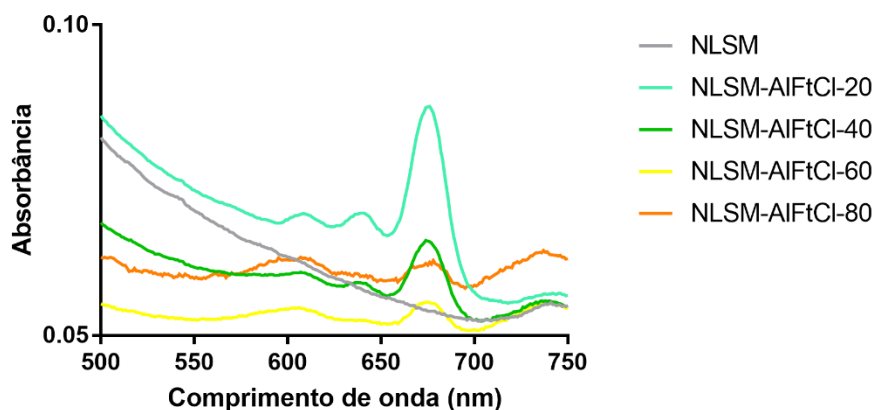


Figura 9 – Resultado da análise da absorvância da NLSM e das NLSM-AIFtCl obtidas. NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40 apresentaram picos de absorvância próximos a 680 nm.

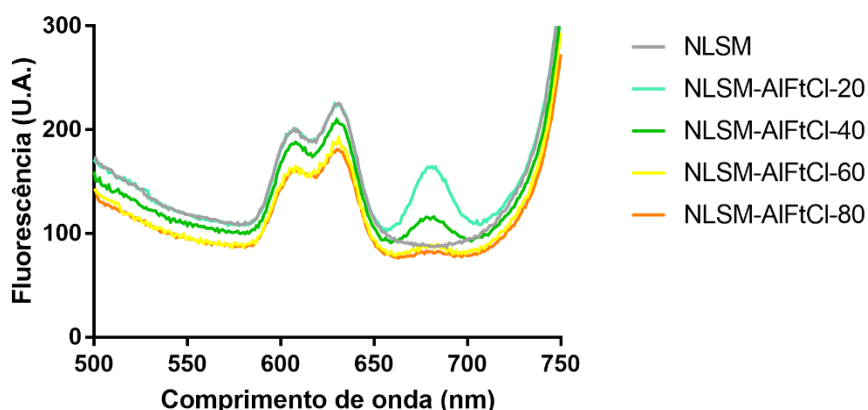


Figura 10 – Resultado da análise da fluorescência (excitação 400 nm) da NLSM e das NLSM-AIFtCl obtidas. Picos relacionados às NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40, próximo a 680 nm (683 e 682 nm, respectivamente).

No que se refere a fluorescência, constatou-se que o aumento da concentração de AIFtCl foi acompanhado de uma redução na emissão de fluorescência, evento relacionado ao efeito de extinção de fluorescência por proximidade entre as moléculas de FS (*quenching*) já observado anteriormente (MUEHLMANN et al., 2015).

Assim, a variação da concentração de AIFtCl nas NLSM-AIFtCl não resultou em diferenças significantes no tamanho médio das partículas, na média de polidispersividade e tampouco no potencial zeta das formulações. Contudo, verificou-se que NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40 apresentaram picos de absorbância e fluorescência próximos a 680 nm e que o aumento da concentração de AIFtCl foi acompanhado de uma redução na emissão de fluorescência (efeito *quenching*).

5.1.3. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS

A eficiência da TFD está intimamente ligada às propriedades físico-químicas dos FS. Os FS apresentam a capacidade de absorver luz e transmitir a energia luminosa absorvida para o oxigênio molecular alterando seu estado energético e formando as EROs.

As respostas celulares estimuladas pelas EROs são diversas. Em baixas concentrações, estas espécies atuam na sinalização celular influenciando processos como modulação da expressão de citocinas, de fatores de crescimento e de fatores de expressão gênica. Em níveis elevados, provocam alteração no transporte iônico das células; liberação de enzimas hidrolíticas lisossomais; formação de produtos citotóxicos; danos em biomoléculas como colesterol e fosfolipídeos insaturados das membranas celulares, proteínas em vários resíduos de aminoácidos, e bases nitrogenadas dos ácidos nucleicos; e, finalmente, indução de morte celular por necrose, apoptose ou autofagia (MILLER et al., 2003; ZHANG et al., 2003; NIKI et al., 2005; BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

A morte por necrose ocorre após danos severos e descontrolados em várias estruturas celulares, causando a perda do controle homeostático, o

aumento do volume celular, a interrupção da função mitocondrial e o rompimento da membrana celular ocorrendo liberação do conteúdo intracelular no tecido, danificando células vizinhas e causando uma resposta inflamatória intensa. Na morte por apoptose, há diminuição do volume celular com a condensação nuclear e do citoplasma, causando perda da aderência com a matriz extracelular e com as células vizinhas. Durante a apoptose a cromatina é condensada, o DNA cromossômico é clivado por endonucleases, formando-se corpos apoptóticos, que, por sua vez, são fagocitados por macrófagos (MCCONKEY, 1998). Ressalta-se que os mecanismos de morte celular não são totalmente independentes, podendo haver múltiplos mecanismos atuando simultaneamente (ZHIVOTOVSKY; ORRENIUS, 2010).

A resposta celular autofágica foi relacionada com a intensidade do estímulo da TFD e, conseqüentemente, com o nível de estresse oxidativo gerado. Em baixas intensidades de luz e de FS, a autofagia atua garantindo a remoção de componentes celulares danificados, prevenindo o início de vias apoptóticas, garantindo assim a viabilidade celular. Em doses médias de TFD, tanto a apoptose quanto a autofagia podem contribuir para a morte celular e, em doses muito elevadas de TFD, observa-se a ocorrência de necrose.

Assim, a fim de verificar a eficiência da produção de EROs pelas NLSM obtidas, utilizou-se o método descrito por Spiller et al. (1998) que faz uso do reagente DBF. O DBF é um reagente degradado por EROs, o que pode ser mensurado pela queda na intensidade de seu pico de absorbância em comprimento de onda de 411 nm.

Corroborando os resultados encontrados na análise de emissão de fluorescência, tanto NLSM-AIFtCl-20 quanto NLSM-AIFtCl-40 apresentaram

elevadas porcentagens de produção de EROs. NLSM-AIFtCl-20 destaca-se por apresentar produção de EROs máxima alcançada em uma densidade de energia de 5,50 J / cm² enquanto as demais formulações ainda apresentavam crescimento em 10,0 J / cm². Conforme esperado, NLSM não produziu EROs sob irradiação (Figura 11).

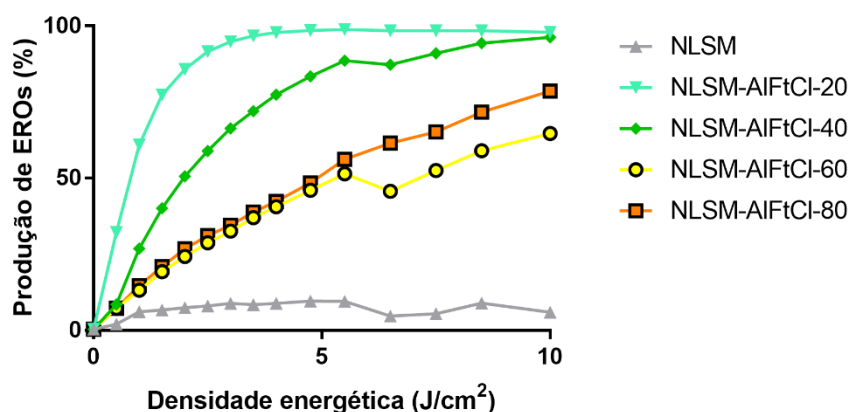


Figura 11 – Produção de ERO's pelo método de degradação do DBF para as diferentes concentrações de FS associadas às NLSM.

Com base nos resultados das análises das propriedades foto-físicas e físico-químicas, as NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40 foram escolhidas para darem continuidade aos experimentos, juntamente com as NLSM sem FS.

5.1.4. ESTABILIDADE SOB ARMAZENAMENTO

Após o desenvolvimento, as NLSM, NLSM-AIFtCl-20 e NLSM-AIFtCl-40 foram selecionadas a partir dos testes anteriores e escolhidas para os testes subsequentes. Para tal, as amostras foram armazenadas a 25 ± 3 °C (T.A.), 37 ± 0,5 °C e 4 ± 1 °C, em abrigo de luz. Os parâmetros de DH, IPD e PZ foram avaliados 1, 15, 30, 45 e 60 dias após o desenvolvimento das partículas. Os resultados obtidos com a avaliação de estabilidade encontram-se expressos nas Figuras 12, 13 e 14.

Durante os 60 dias de observação, os três nanossistemas mantiveram-se estáveis em T.A. e 4 °C, não apresentando alteração significativa ($p < 0,05$) de DH, IDP e PZ. Nanopartículas lipídicas sólidas sintetizadas a partir de manteiga de murumuru por meio do método PIT também foram avaliadas por GOMES et al., 2019 e demonstraram alta estabilidade por 120 dias, revelando boas perspectivas para o futuro das NLSM produzidas neste estudo.

As amostras mantidas em estufa (37 °C) começaram a apresentar alterações no DH e no IPD entre 45 e 60 dias, indicando instabilidade. Tal instabilidade é justificável, já que o ponto de fusão da manteiga de murumuru está no intervalo entre 30 e 35 °C e a temperatura elevada da estufa provavelmente interferiu no arranjo do sistema e favoreceu a formação de agregados.

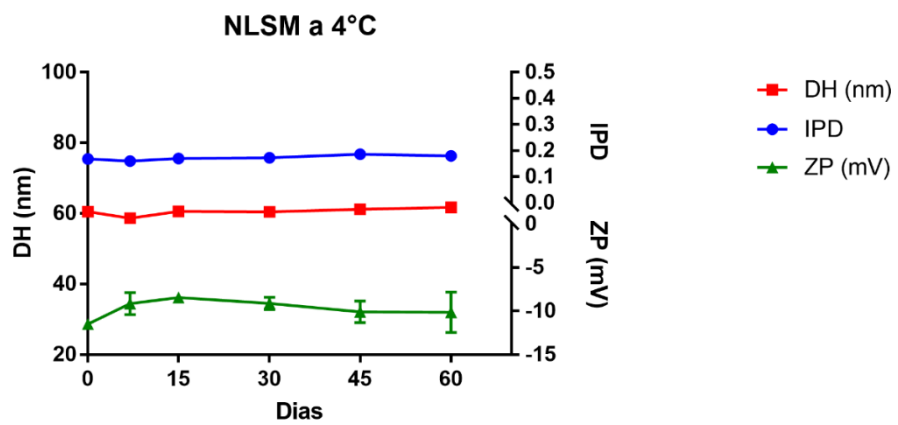
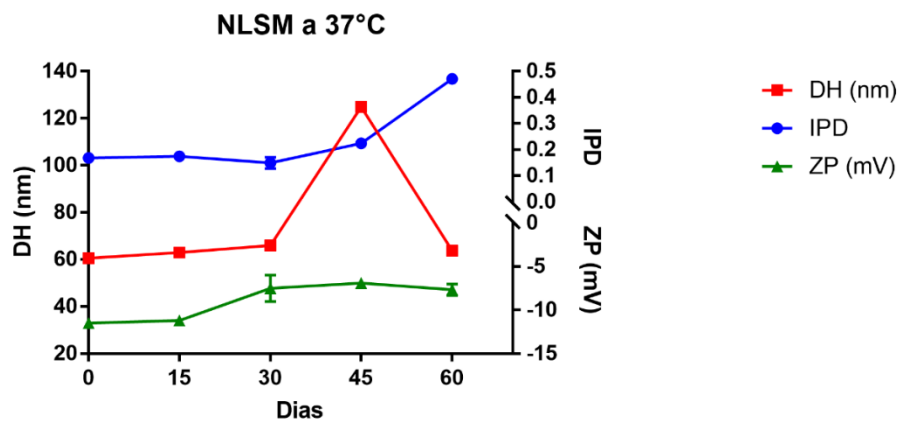
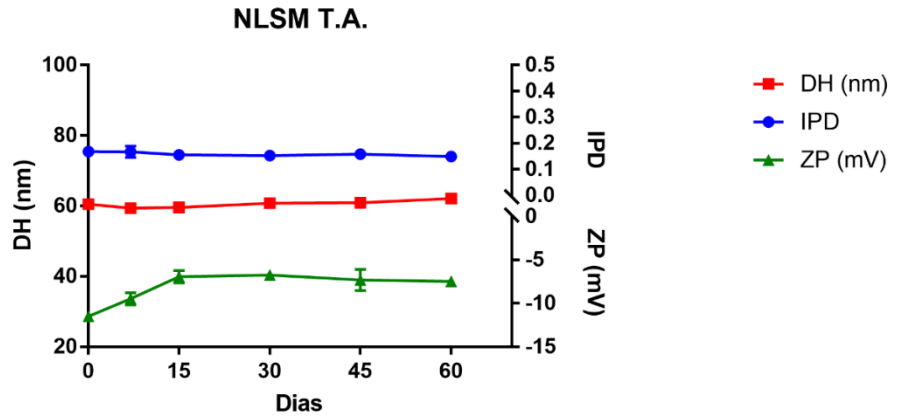


Figura 12 – Estabilidade NLSM pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 60 dias, à T.A., 37°C e 4° C.

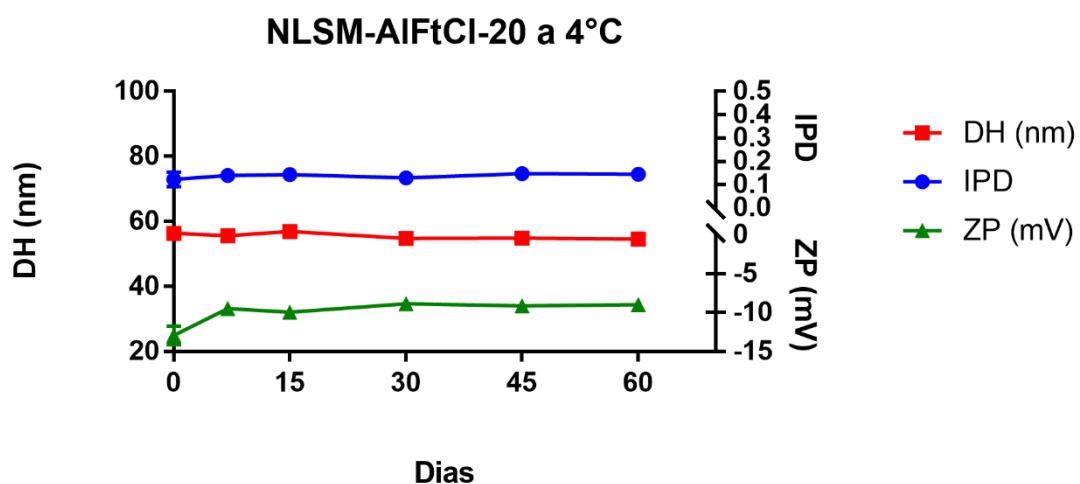
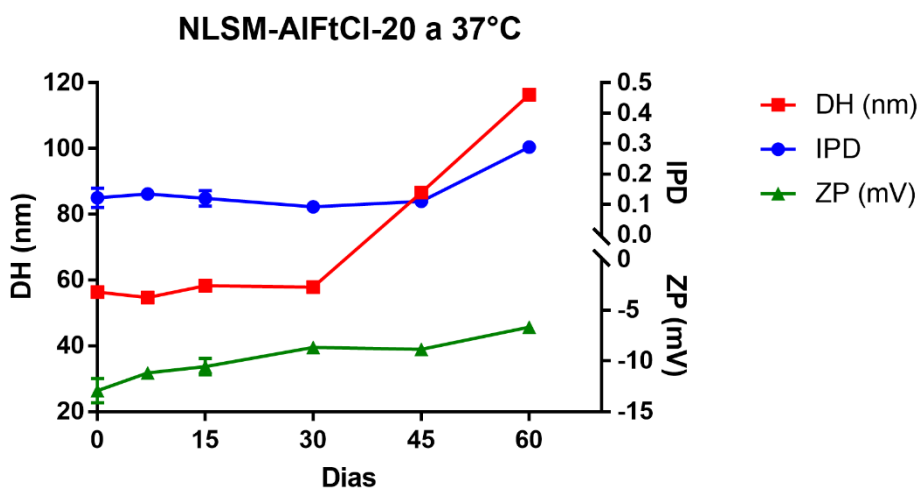
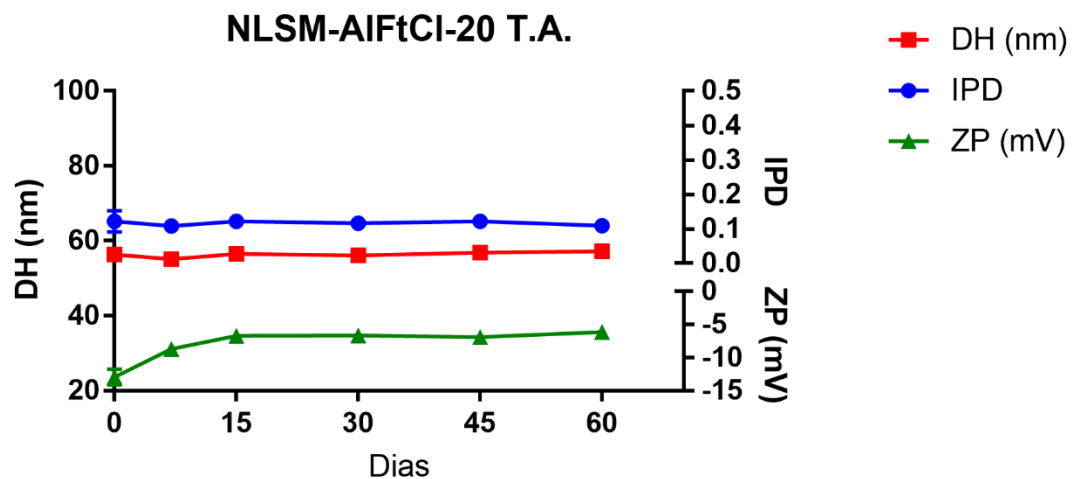


Figura 13 – Estabilidade NLSM-AIFtCl-20 pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 60 dias, à T.A., 37°C e 4° C.

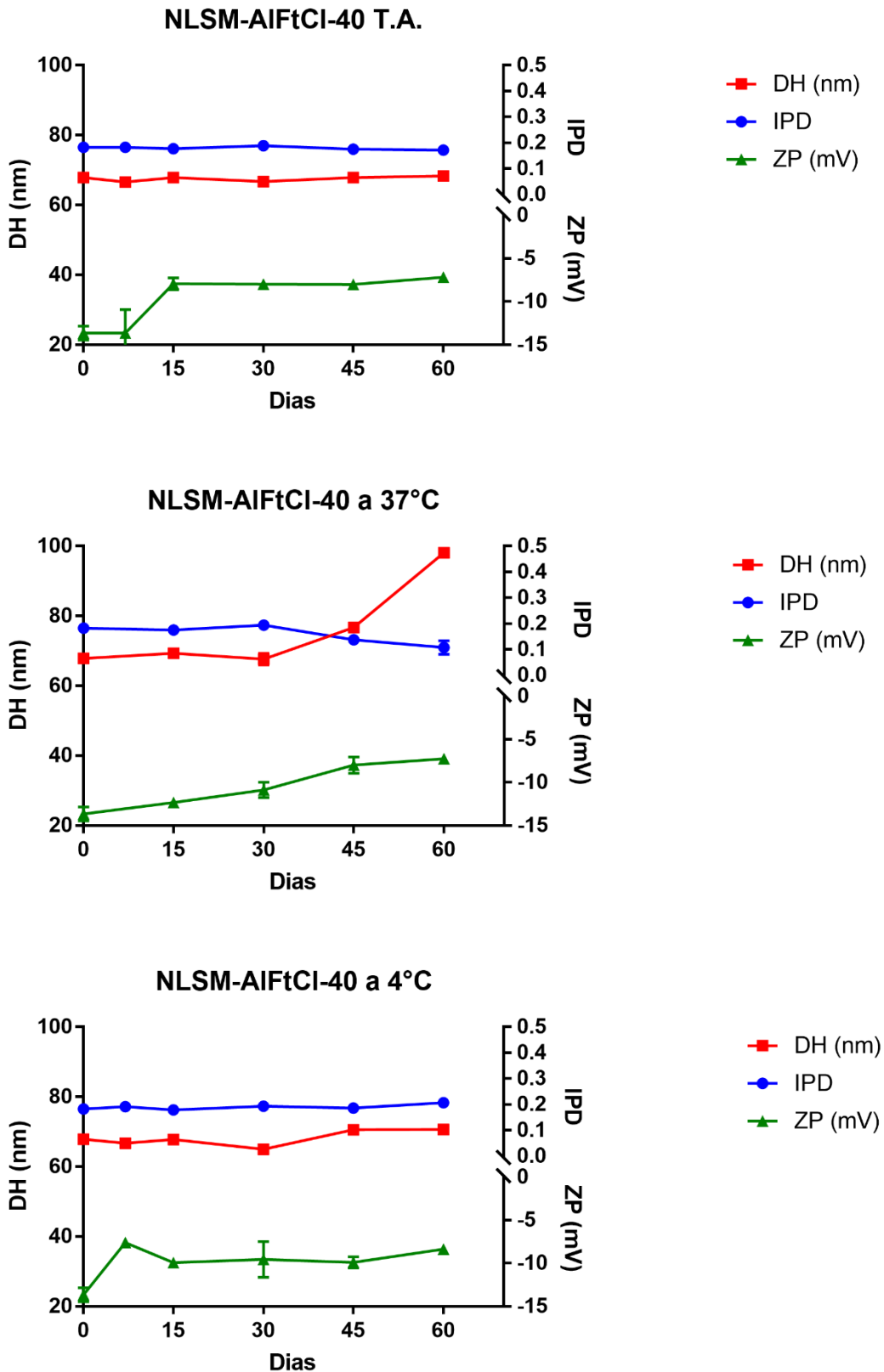


Figura 14 – Estabilidade NLSM-AIFtCl-40 pelos parâmetros de DH, IPD e PZ, de 1 a 60 dias, à T.A., 37°C e 4° C.

5.2. Ensaio *In Vitro* Para a Avaliação da Segurança e Eficácia

5.2.1. CITOTOXICIDADE *IN VITRO*

As NLSM, NLSM-AIFtCI-20 e NLSM-AIFtCI-40 foram testadas para comprovar sua atividade no escuro e quando expostas ao LED.

Nos testes *in vitro* em células de melanoma murino (B16F10), a luz LED por si só não afetou diretamente a viabilidade das células testadas, como demonstrado na Figura 15. Este resultado está de acordo com os descritos na literatura, já que esta fonte de luz emite luz em baixa intensidade, com pouco potencial de promover danos às biomoléculas. Com relação aos efeitos promovidos pela NLSM sem fotossensibilizador, também não foram observados efeitos citotóxicos quando o nanocarreador foi exposto às células no escuro. Esse resultado no escuro é um bom indicador de biocompatibilidade, demonstrando o baixo potencial citotóxico desta formulação.

Em contrapartida, quando as células foram expostas ao sistema nanoestruturado contendo a AIFtCI, observamos uma diminuição significativa na viabilidade celular das células B16F10 contendo NLSM-AIFtCI-20, com concentração inibitória (citotóxica) de 50% (IC₅₀) de 19,62 nM. Já para NLSM-AIFtCI-40, o valor de IC₅₀ foi 53,84 nM.

Por fim, durante a avaliação da TFD, que envolveu a exposição das células aos nanocarreadores contendo AIFtCI e subsequente exposição ao LED, observamos que a NLSM-AIFtCI-20 apresentou melhor atividade fotodinâmica do que a NLSM-AIFtCI-40 (Figura 15B). Tal comportamento pode ser justificado pelo efeito de supressão de fluorescência (*quenching*), já mencionado anteriormente (Figuras 9 e 10). Esse fenômeno ocorre pois o confinamento nanoscópico criado pela nanopartícula permite o carregamento de um número

limitado de moléculas fotossensibilizadoras. À medida que esta concentração é ultrapassada, podem ocorrer fenômenos relacionados à agregação molecular, formando dímeros e grandes agregados de fármacos. Devido a esta agregação a energia de excitação dos fármacos não consegue ser transmitido para fora do sistema, criando espaços de ressonância das energias de excitação criadas durante o processo fotodinâmico.

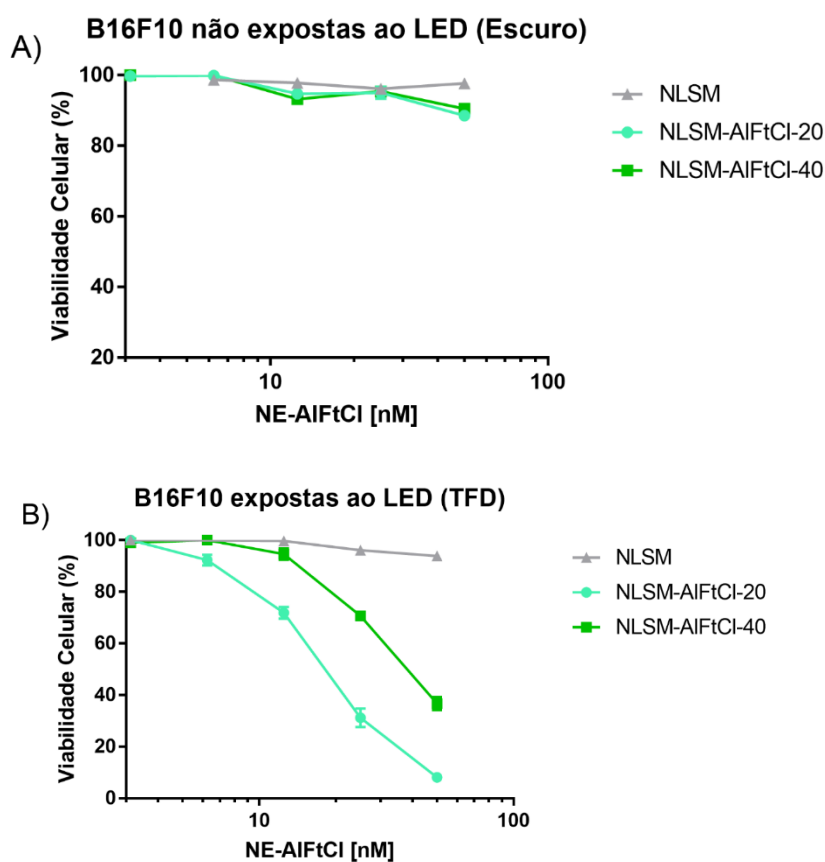


Figura 15 – Viabilidade de células B16F10 expostas a NLSM, a NLSM-AIFtCI-20 e a NLSM-AIFtCI-40, avaliada pelo método MTT 24h após tratamento. (A) Células tratadas mantidas no escuro; (B) Células tratadas e irradiadas por LED (660nm, 25.88 J/cm²).

Ambas as concentrações demonstraram ausência de toxicidade no escuro (Figura 15-A), o que é um requisito geral para os sistemas de FS, pois garante que apenas os tecidos contendo o FS e irradiados sejam afetados pelos

efeitos tóxicos da TFD (ROBERTSON; EVANS; ABRAHAMSE, 2009; MUEHLMANN et al., 2015).

Em resumo, nos experimentos biológicos *in vitro*, constatou-se que NLSM não apresentou citotoxicidade. NLSM-AIFtCI-20 e NLSM-AIFtCI-40 demonstraram ausência de toxicidade no escuro e uma significativa redução na viabilidade celular, quando submetidas à luz (LED – 660 nm, 25.88 J/cm²). NLSM-AIFtCI-20 se mostrou mais eficiente na indução de morte celular, com concentração inibitória (citotóxica) de 50% (IC₅₀) de 19,62 nM, contra 53,84 nM de IC₅₀ para NLSM-AIFtCI-40.

5.2.2. ANÁLISE DA MORFOLOGIA DAS CÉLULAS TRATADAS COM NLSM-AIFtCI-20

A análise morfológica de culturas de células de melanoma murino B16F10 por microscopia eletrônica de varredura (MEV), representada na Figura 16, mostrou diferenças na morfologia nos diferentes grupos de tratamento.

Nas células expostas ao MTX, foi observado um decréscimo na densidade celular, típico da perda da forma e de nutrientes causados pela apoptose, e também no número de células. Foi possível observar, ainda, a formação de corpos apoptóticos e de bolhas citoplasmáticas.

Tomando como base as observações feitas no grupo de MTX (Figura 16-D), verificou-se, nas células expostas à NLSM-AIFtCI-20 e irradiadas (Figura 16-C), alterações semelhantes às do grupo anterior (formação de corpos apoptóticos e bolhas citoplasmáticas), o que sugere indução de morte celular por apoptose. Essas alterações estão ausentes no grupo controle e nas células tratadas com NLSM-AIFtCI-20 e não irradiadas (Figuras 16-A e 16-B).

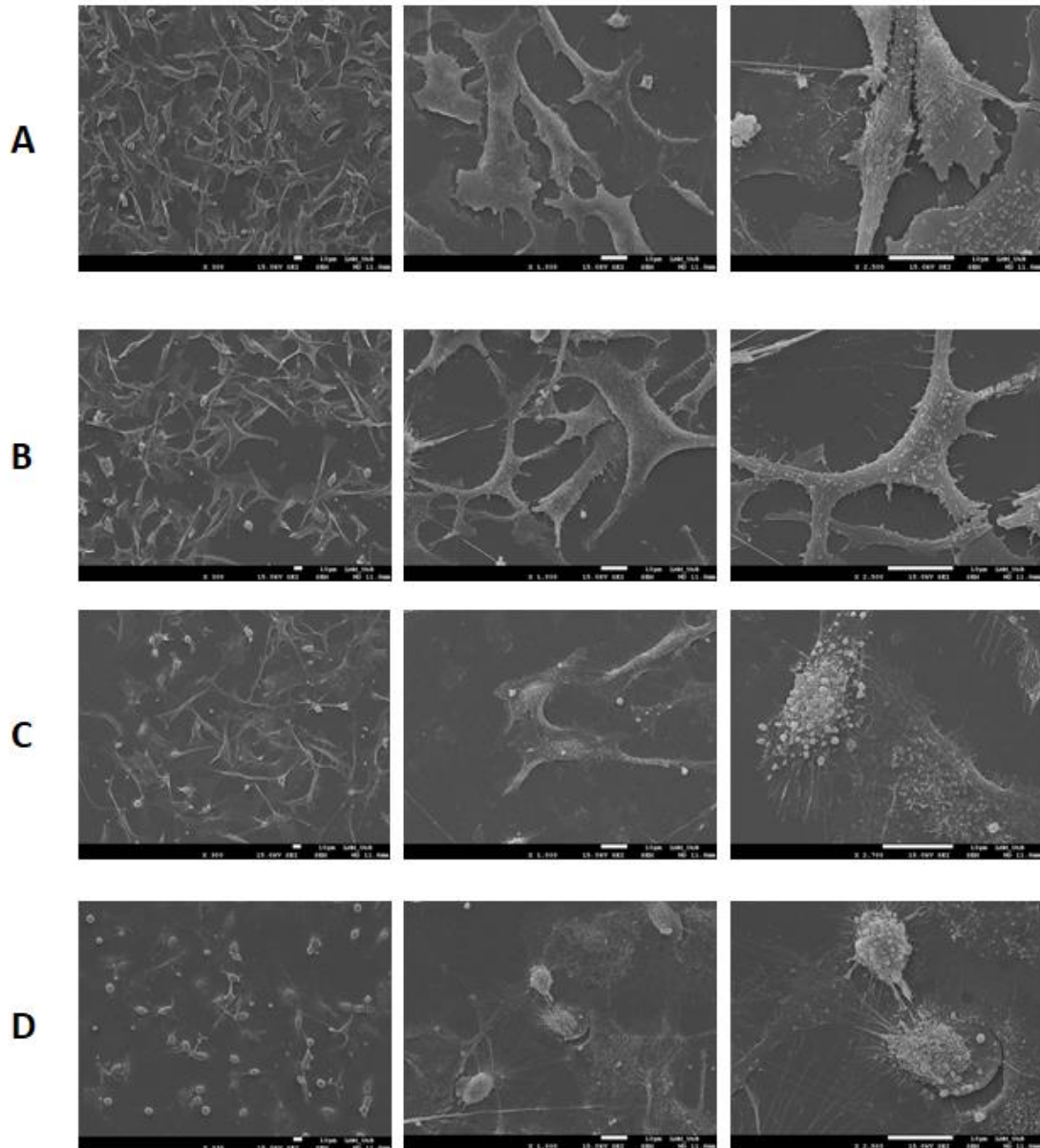


Figura 16 – Análise morfológica por microscopia eletrônica de varredura (MEV) para analisar a atividade fotodinâmica da NLSM-AIFtCl-20. (A) Morfologia das células contendo apenas meio de cultivo; (B) Morfologia das células tratadas com NLSM-AIFtCl-20 IC50 no escuro; (C) Morfologia das células tratadas com NLSM-AIFtCl-20 IC50 irradiadas; (D) Morfologia das células tratadas com MTX como controle positivo para apoptose.

Pode-se notar, ainda, a diminuição significativa no número de células nas imagens relativas ao grupo tratado com NLSM-AIFtCl-20 e irradiado (Figura 16-C) quando comparadas com as do grupo controle (Figura 16-A).

Ou seja, as células de melanoma murinho (B16F10), quando tratadas com NLSM-AIFtCl-20, apresentaram características da formação de corpos

apoptóticos e bolhas citoplasmáticas semelhantes ao apresentado pelas células tratadas com mitoxantrona (MTX), o que sugere indução de morte celular por apoptose.

6. CONCLUSÃO

Outras análises ainda se mostram necessárias para verificação da eficácia das NLSM-AIFtCI obtidas, entre elas a avaliação da estabilidade por períodos mais longos e testes *in vivo*. Por ora, os resultados obtidos indicam que foi possível obter NLS com baixo custo de produção e boa estabilidade inicial, com excelentes propriedades coloidais, foto-físicas e físico-químicas. Ademais, a NLSM-AIFtCI-20 se mostrou eficiente para o carreamento de AIFtCI, com excelente atividade fotodinâmica e ausência de toxicidade quando não irradiada, apresentando resultados que sugerem indução de morte celular por apoptose quando utilizada na TFD.

Diante do exposto, fica evidente a importância de se estimular novas pesquisas envolvendo o desenvolvimento de produtos nanoestruturados derivados de manteigas da biodiversidade brasileira, pois apresentam resultados satisfatórios, incentivam o desenvolvimento farmacêutico de novas alternativas terapêuticas utilizando matérias-primas biocompatíveis e sustentáveis e criam oportunidades econômicas, podendo, inclusive, aumentar o poder competitivo de indústrias farmacêuticas do Brasil no âmbito mundial.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250–281, 2011.

ALEXIS, F. et al. Factors affecting the clearance and biodistribution of polymeric nanoparticles. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 4, p. 505–515, 2008.

ALLISON, R. R. et al. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers : A clinical review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 7, n. 2, p. 61–75, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pdpdt.2010.02.001>>.

ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates-A review. **Journal of Controlled Release**, v. 128, n. 3, p. 185–199, 2008.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Oxidative stress: Relations between the formation of reactive species and the organism's defense. **Quimica Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BAYÓN-CORDERO, L.; ALKORTA, I.; ARANA, L. Application of Solid Lipid Nanoparticles to Improve the Efficiency of Anticancer Drugs. **Nanomaterials**, v. 9, n. 3, p. 474, 2019.

BELOQUI, A. et al. Nanostructured lipid carriers: Promising drug delivery systems for future clinics. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 12, n. 1, p. 143–161, 2016.

BUGGE, M. M.; HANSEN, T.; KLITKOU, A. What is the bioeconomy? A review of the literature. **Sustainability**, v. 8, n. 7, p. 691, 2016.

CALIXTO, G. M. F. et al. Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: a review. **Molecules**, v. 21, n. 3, p. 342, 2016.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: Part one - Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 4, p. 279–293, 2004.

COELHO, A. G. et al. Plant derived butters as lipid nanocarriers: a systematic and prospective review. **Recent Patents on Nanotechnology**, v. 14, 2020.

CONTE, C. et al. Polymeric Nanoparticles for Cancer Photodynamic Therapy. In: [s.l: s.n.]p. 61–112.

CORRIAS, F.; LAI, F. New Methods for Lipid Nanoparticles Preparation. **Recent Patents on Drug Delivery & Formulation**, v. 5, n. 3, p. 201–213, 2011.

DE MATOS, S. P. et al. Essential oils and isolated terpenes in nanosystems designed for topical administration: a review. **Biomolecules**, v. 9, n. 4, p. 138, 2019.

DOLMANS, D. E.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature reviews cancer**, v. 3, n. 5, p. 380, 2003.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic Therapy. v. 90, n. 12, p. 889–905, 1998.

DURMUS, M. Synthesis , photophysical and photochemical properties of substituted zinc phthalocyanines †. n. Dcm, p. 3782–3791, 2007.

ETHIRAJAN, M. et al. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 40, n. 1, p. 340–362,

2011.

FONSECA-SANTOS, B. et al. Formulating SLN and NLC as innovative drug delivery systems for non-invasive routes of drug administration. **Current medicinal chemistry**, 2019.

GAO, S.; MCCLEMENTS, D. J. Formation and stability of solid lipid nanoparticles fabricated using phase inversion temperature method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 499, p. 79–87, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2016.03.065>>.

GARG, A. D.; AGOSTINIS, P. ER stress, autophagy and immunogenic cell death in photodynamic therapy-induced anti-cancer immune responses. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 13, n. 3, p. 474–487, 2014.

GESZKE-MORITZ, M.; MORITZ, M. Solid lipid nanoparticles as attractive drug vehicles: Composition, properties and therapeutic strategies. **Materials Science and Engineering C**, v. 68, p. 982–994, 2016.

GHASEMIYEH, P.; MOHAMMADI-SAMANI, S. Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages. **Research in pharmaceutical sciences**, v. 13, n. 4, p. 288, 2018.

GOMES, G. V. L. et al. β -carotene and α -tocopherol coencapsulated in nanostructured lipid carriers of murumuru (*Astrocaryum murumuru*) butter produced by phase inversion temperature method: characterisation, dynamic in vitro digestion and cell viability study. **Journal of Microencapsulation**, v. 36, n. 1, p. 43–52, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/02652048.2019.1585982>>.

GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. **Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release**. [s.l.] Elsevier B.V., 2018. v. 133

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. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 518, n. 1–2, p. 228–241, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2017.01.004>>.

H MULLER, R.; SHEGOKAR, R.; M KECK, C. 20 years of lipid nanoparticles (SLN & NLC): present state of development & industrial applications. **Current drug discovery technologies**, v. 8, n. 3, p. 207–227, 2011.

HARE, J. I. et al. Challenges and strategies in anti-cancer nanomedicine development: an industry perspective. **Advanced drug delivery reviews**, v. 108, p. 25–38, 2017.

HELGASON, T. et al. Effect of surfactant surface coverage on formation of solid lipid nanoparticles (SLN). **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 334, n. 1, p. 75–81, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2009.03.012>>.

HOPPER, C. **Photodynamic therapy: A clinical reality in the treatment of**

cancerLancet Oncology, 2000. .

HU, L.; TANG, X.; CUI, F. Solid lipid nanoparticles (SLNs) to improve oral bioavailability of poorly soluble drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 12, p. 1527–1535, 2004.

IDOWU, M.; NYOKONG, T. Photophysical and photochemical properties of zinc and aluminum phthalocyanines in the presence of magnetic fluid. v. 188, p. 200–206, 2007.

IZQUIERDO, P. et al. Phase behavior and nano-emulsion formation by the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 20, n. 16, p. 6594–6598, 2004.

IZQUIERDO, P. et al. The influence of surfactant mixing ratio on nano-emulsion formation by the pit method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 285, n. 1, p. 388–394, 2005.

JINTAPATTANAKIT, A. Preparation of nanoemulsions by phase inversion temperature (PIT) method. **Pharmaceutical Sciences Asia**, v. 45, n. 1, p. 1–12, 2018.

KUMAR, A.; DIXIT, C. K. Methods for characterization of nanoparticles. **Advances in Nanomedicine for the Delivery of Therapeutic Nucleic Acids**, p. 44–58, 2017.

KWIATKOWSKI, S. et al. **Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations** *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2018. .

LAPPANO, R. et al. The lauric acid-activated signaling prompts apoptosis in cancer cells. **Cell death discovery**, v. 3, p. 17063, 2017.

LI, T.; YAN, L. Functional polymer nanocarriers for photodynamic therapy. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, p. 133, 2018.

LI, X. et al. Phthalocyanines as medicinal photosensitizers: Developments in the last five years. **Coordination Chemistry Reviews**, v. 379, p. 147–160, 2019.

LIEBERMAN, S.; ENIG, M. G.; PREUSS, H. G. A review of monolaurin and lauric acid: natural virucidal and bactericidal agents. **Alternative & Complementary Therapies**, v. 12, n. 6, p. 310–314, 2006.

LONGO, J. P. F. et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 94, n. 2, p. 143–146, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2008.11.003>>.

MAMBRIN, M. C.; BARRERA ARELLANO, D. Caracterización de aceites de frutos de palmeras de la región amazónica del Brasil. **Grasas y aceites**, 1997.

MCCLEMENTS, D. J.; RAO, J. Food-Grade nanoemulsions: Formulation, fabrication, properties, performance, Biological fate, and Potential Toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p. 285–330, 2011.

MCCONKEY, D. J. Biochemical determinants of apoptosis and necrosis. **Toxicology Letters**, v. 99, n. 3, p. 157–168, 1998.

MEI, Z. et al. Preparation of positively charged oil/water nano-emulsions with a sub-PIT method. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 361, n. 2, p. 565–572, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2011.05.011>>.

MILLER, T. J. et al. CI-1010 induced opening of the mitochondrial permeability transition pore precedes oxidative stress and apoptosis in SY5Y neuroblastoma cells. **Brain Research**, v. 963, n. 1–2, p. 43–56, 2003.

MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO AGRÁRIO-MDA; MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE-MMA; MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO SOCIAL E COMBATE À FOME-MDS. **Plano Nacional de Promoção das Cadeias de Produtos da Sociobiodiversidade**MDA: MMA: MDS Brasília, , 2009. .

MONGE-FUENTES, V. et al. Photodynamic therapy mediated by acai oil (*Euterpe oleracea* Martius) in nanoemulsion: A potential treatment for melanoma. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 166, p. 301–310, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.12.002>>.

MOORE, T. L. et al. Nanoparticle colloidal stability in cell culture media and impact on cellular interactions. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 17, p. 6287–6305, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1039/C4CS00487F>>.

MORAIS, J. M.; ROCHA-FILHO, P. A.; BURGESS, D. J. Influence of phase inversion on the formation and stability of one-step multiple emulsions. **Langmuir**, v. 25, n. 14, p. 7954–7961, 2009.

MORAIS, L. R. B. **Química de oleaginosas: valorização da biodiversidade amazônica**. [s.l.] GTZ, 2009.

MORALES, D. et al. A study of the relation between bicontinuous microemulsions and oil/water nano-emulsion formation. **Langmuir**, v. 19, n. 18, p. 7196–7200, 2003.

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

MUEHLMANN, A. L. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1–11, 2015.

MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminum--phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 9, p. 1199, 2014.

NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, n. 1, p. 668–676, 2005.

O'CONNOR, A. E.; GALLAGHER, W. M.; BYRNE, A. T. Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: Preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 85, n. 5, p. 1053–1074, 2009.

PESCE, C. **Oleaginosas da Amazônia**. [s.l.] IICA, Brasília, DF (Brasil), 2009.

PIMM, S. L. et al. The biodiversity of species and their rates of extinction, distribution, and protection. **Science**, v. 344, n. 6187, p. 1246752, 2014.

PÜLZL, H.; KLEINSCHMIT, D.; ARTS, B. Bioeconomy--an emerging meta-discourse affecting forest discourses? **Scandinavian Journal of Forest Research**, v. 29, n. 4, p. 386–393, 2014.

QIDWAI, A. et al. Role of Nanocarriers in photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, p. 101782, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.101782>>.

ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. H.; ABRAHAMSE, H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 1–8, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2009.04.001>>.

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. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 204, n. July 2019, p. 111808, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2020.111808>>.

SCHALBART, P.; KAWAJI, M.; FUMOTO, K. Formation of tetradecane nanoemulsion by low-energy emulsification methods. **International Journal of Refrigeration**, v. 33, n. 8, p. 1612–1624, 2010.

SERRA, J. L. et al. Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocopherols, total carotenoids and chemical composition. **Food research international**, v. 116, p. 12–19, 2019.

SKIRYCYZ, A. et al. Medicinal bioprospecting of the Amazon rainforest: a modern Eldorado? **Trends in biotechnology**, v. 34, n. 10, p. 781–790, 2016.

SORTINO, S. **Light-Responsive Nanostructured Systems for Applications in Nanomedicine**. [s.l.: s.n.]v. 370

SOS AMAZÔNIA. **Boas práticas para coleta e beneficiamento do Murmuru**. [s.l.: s.n.]

SPILLER, W. et al. Singlet oxygen quantum yields of different photo-sensitizers in polar solvents and micellar solutions. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 2, n. 2, p. 145–158, 1998.

TER STEEGE, H. et al. Hyperdominance in the Amazonian tree flora. **Science**, v. 342, n. 6156, p. 1243092, 2013.

TUCKER, J. L. Green chemistry, a pharmaceutical perspective. **Organic process research & development**, v. 10, n. 2, p. 315–319, 2006.

VAN ELK, M. et al. Nanomedicines for advanced cancer treatments: Transitioning towards responsive systems. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 515, n. 1–2, p. 132–164, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.10.013>>.

VILLA NOVA, M. et al. Nanocarriers for photodynamic therapy - Rational formulation design and medium-scale manufacture. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 491, n. 1–2, p. 250–260, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.06.024>>.

WAGNER, V. et al. The emerging nanomedicine landscape. **Nature biotechnology**, v. 24, n. 10, p. 1211, 2006.

WANG, K. et al. A xanthene derivative, free or associated to nanoparticles, as a new potential agent for anticancer photodynamic therapy. **Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition**, v. 5063, p. 1–17, 2020.

ZHANG, J. et al. An updated overview on the development of new photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 8, n. 2, p. 137–146, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.apsb.2017.09.003>>.

ZHANG, Z. et al. Role of reactive oxygen species and MAPKs in vanadate-induced G2/M phase arrest. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 34, n. 10, p. 1333–1342, 2003.

ZHIVOTOVSKY, B.; ORRENIUS, S. Cell death mechanisms: Cross-talk and role in disease. **Experimental Cell Research**, v. 316, n. 8, p. 1374–1383, 2010.