



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Genética e Morfologia
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Victor Carlos Mello da Silva

Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo alumínio-ftalocianina para terapia fotodinâmica contra melanoma: desenvolvimento, caracterização e teste de eficácia in vitro

Tese de Doutorado

Brasília
04/03/2022

Victor Carlos Mello da Silva

Carreadores lipídicos nanoestruturados contendo alumínio-ftalocianina para terapia fotodinâmica contra melanoma: desenvolvimento, caracterização e teste de eficácia in vitro

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de doutor em biologia animal.

Orientador: Luis Alexandre Muehlmann

Brasília
04/03/2022

Pelo afeto, incentivo, dedicação, cuidado, apoio e suporte que minha família me deu durante toda a minha vida, dedico esta tese a eles. Com muito amor e gratidão.

AGRADECIMENTOS

Meu trabalho: Resolver problemas, questionar e inovar. Para que eu entendesse a grandiosidade do que é ser CIENTISTA, tive o melhor orientador que eu poderia ter. Obrigado, **Professor Luis Alexandre Muehlmann** por ser meu orientador por 8 anos, durante os PIBICS, PIBITI, TCC, Mestrado e o Doutorado que aqui apresento. Lembro cada detalhe do dia em que conversamos pela primeira vez. Ao ver um doutor tão jovem, decidi ali que também queria ser doutor antes dos 30. Obrigado pelas inúmeras conversas, brainstormings, apoio, e principalmente por me inspirar. Você me disse, um dia, que cientistas podem fazer qualquer coisa, resolver qualquer problema. Ali percebi que resolver problemas era o que eu queria fazer, seja na academia, no empreendedorismo ou na vida. Estar alinhado com quem você é com o que você faz não tem preço. OBRIGADO!

Também agradeço ao **Prof. Luis Muehlmann** por ter me inserido como membro do seu grupo de pesquisa durante todos esses anos. No **IMUNONANO**, conheci pesquisadores incríveis e que se tornariam grandes amigos. Um obrigado especial para a Katy e Ray, vocês são exemplos de farmacêuticas e pesquisadoras. Obrigado pelas risadas, pela amizade e por sempre estarem dispostas a me ajudar. Ray, obrigado por ter me ensinado tanto. Katy, a blogueira cientista, a globo está te perdendo.

É grandioso poder conviver com pessoas com vivências tão únicas. A **Fabi**, outro presente do **IMUNONANO**, me ensinou muito sobre sonhos: “Na ciência falta isso, falta aquilo. Mas você não pode deixar faltar em você, a vontade de ser, o que você quer ser”. Já perdi as contas do quanto choramos pelos corredores da UnB rs. **Fabi**, você é inspiradora e um exemplo, não apenas para mim, mas para inúmeras outras meninas que enfrentam a carreira acadêmica e a maternidade. Te amo.

Dafne, meu deus. Impossível eu descrever aqui o quanto você foi essencial nos últimos anos. Começou me acompanhando nos experimentos e hoje todo mundo já pergunta se você é mestranda ou doutoranda. Já foi minha IC, assistente nas empresas, amiga e hoje considero como parte da minha família, minha “Chosen Family”. Me emociono em pensar o quanto você amadureceu nos últimos anos. Quando você perceber o quanto você é incrível, o céu será o limite. O mundo é seu <3.

Não poderia deixar de agradecer minha rede de apoio, aqueles que convivo mais do que minha própria família de sangue. **Marina Radicchi**, a mãezona; **Gabs**, a sis fofa; **Dafne, Carol Cantina e Sophia Lauren**, as filhas que mimo; **Gin, Toni e Lemon, e Samila** as gatinhas da família :). Não precisamos compartilhar genes ou sobrenome. Obrigado, House of Vics. Vocês são a família que escolhi.

Mari, obrigado por planejar tudo, cuidar de todos e por sempre estabelecer os limites. Obrigado por ser tão prestativa, organizada, e por me apoiar na vida e nos experimentos. Estar com você é sempre mais fácil, já que não preciso me preocupar com tudo o tempo todo. Fico tranquilo quando você está, já que as chances de algo dar errado são mais baixas.

E, obrigado pela ajuda com as pranchas da Tese.

Gabs, obrigado por ser o irmão que não tive. Obrigado pelos rolês, pelos choros, pelas risadas sem fim, pelos vários tabaquinhos entre experimentos, pelos momentos de reflexão, pelos brainstormings, pela ajuda com os experimentos *in vivo*, você é o melhor. Obrigado pelo suporte, pela amizade e por ser uma pessoa tão doce, sensível e incrível. Te amo <3

Carol Cantina, obrigado por sempre ficar do meu lado ouvindo música enquanto estudo. A melhor companhia de escrita e responsável por grande parte da escrita da tese <3. Mais do que isso, você é a melhor companhia a qualquer momento e em qualquer lugar. Me sinto dono do mundo quando estou com você. Obrigado por deixar tudo mais fácil.

Marc, ou **Sophia Lauren** para os íntimos rs. O caçula da família, mas que nos faz perceber que maturidade nem sempre está associado com idade. Obrigado pelas conversas, pela companhia na madrugada, pelos *clases*, pelas viagens, por me receber tão bem sempre e por tantos momentos lindos. Você faz a diferença, anjinhe. Te amo <3

Poucas vezes estive realmente satisfeito e feliz com algo que fiz. Hoje, tenho um orgulho gigante em apresentar não apenas minha tese de doutorado, mas quem eu me tornei, como profissional e como pessoa. Sou infinitamente grato pelas oportunidades que recebi.

Assim, gostaria de agradecer o **Prof. João Paulo Longo** e **Prof. Ricardo Bentes** por ter aberto espaço para mim em seus laboratórios e também em seus projetos. **Prof. João Paulo**, obrigado por me fazer entender o método científico com um olhar diferente, e mostrar que a ciência também precisa de empreendedores. **Prof. Ricardo**, obrigado pelos inúmeros ensinamentos, compartilhamento de experiências, sou grato inclusive pelas chamadas de atenção. Você é uma referência para mim, e com você, aprendo não apenas ciência, mas outros atributos importantes para um pesquisador, como: organização, gestão, relações interpessoais, pensamento crítico e inúmeros outros.

A vida na pesquisa é feita de brainstormings. Sou grato por ser inspirado todos os dias por diversas pessoas incríveis que vou conhecendo pelo percurso. Sou infinitamente grato pela amizade e apoio de professores que conheci na graduação e que hoje considero grandes amigos. Obrigado, **Prof. Marcelinho**, **Profa. Eliana Gris** e **Profa. Izabel Rodrigues**. Vocês foram e são essenciais. Espero que tenhamos mais oportunidades de trabalharmos juntos <3.

Mulheres fortes sempre me inspiraram, e gostaria de agradecer mulheres cientistas incríveis que fizeram toda a diferença. Obrigado, **Dra. Patricia Bento**, **Dra. Carolina Lucci**, **Dra. Karen Py-Daniel**, **Dra. Jaque Sol** e **Dra. Mônica Garcia**. Vocês são inspirações! Obrigado pelo apoio e amizade. Dra. Patricia Bento, obrigado por ser a melhor companhia da madrugada de trabalho, você merece todos os chocolates e sucesso do mundo.

Ainda sobre mulheres inspiradoras, obrigado **Profa. Sônia Nair Bão**. Obrigado por me acolher em seu grupo de pesquisa durante meu doutorado, obrigado por me cobrar e

me incentivar a ser melhor. Você é um exemplo e percebo o quanto evoluí e amadureci durante esse período no **Laboratório de Microscopia e Microanálise (LMM)**. Obrigado por me fornecer tudo o que eu precisei para a realização dos experimentos, obrigado por me orientar. Você é um exemplo para mim e se eu me tornar 10% do que você é, terei atingido meu objetivo de vida. Obrigado pelo pós-doutorado, e, principalmente, obrigado por acreditar em mim. Espero atingir as expectativas. OBRIGADO <3.

Durante meu período no **LMM**, conheci pesquisadoras incríveis. No início, fiquei surpreso por ser tão bem recebido e acolhido. Agradeço todos os membros do **LMM** por me tratarem tão bem e sempre estarem dispostas a ajudar. Um obrigado especial para a **Giovanna, Melissa, Ingrid, Lais e Karine**. Mesmo antes da possibilidade de pós-doc, eu já me sentia como membro do grupo de pesquisa, e vocês foram as responsáveis por isso.

No **LMM**, também conheci a **Jovem Marina** e a **Karen Paiva**. Trabalhar com vocês, é tão divertido e empolgante. Obrigado por deixarem tudo mais leve e divertido. É impressionante como nos entendemos trocando três palavras, um rabisco, dois olhares e um gesto com as mãos. Obrigado por contribuírem para que meus dias no laboratório sejam tão significativos.

Agradeço também cada um dos **ImunoJovens**. Vocês me fazem querer ser o melhor orientador da UnB e me fazem perceber que é isso que quero para a vida: contribuir para a formação de futuros grandes cientistas. Ver cada olhinho brilhando quando falam de seus projetos ou quando apresentam seus resultados me deixa emocionado (vocês já devem ter percebido). Espero que estejam se divertindo e aprendendo todos os dias quando estão trabalhando em seus experimentos. **Dora, Dafne, Luísa, Victor, Luis e Marcella**, vocês são especiais e cada um tem uma característica única, o que nos torna um grupo completo e com diferentes formas de pensar, afinal, é disso que a ciência é feita. Obrigado por tudo!

Deixo também um enorme abraço de gratidão para as secretárias de pós-graduação **Kássia e Luciana**. Elas estão acima da média quando falamos de simpatia e eficiência. Defendi tanto o mestrado e doutorado em menos tempo e, sem dúvidas, não teria conseguido sem as suas orientações e apoio para que os processos fossem resolvidos com tanta celeridade.

Nos últimos anos, dividi meu tempo entre os laboratórios e as empresas. Não posso deixar de agradecer aqueles que deixaram essa carga mais leve, que tornaram possível o crescimento das empresas mesmo quando eu não podia me dedicar totalmente. Um grande obrigado às incríveis **Camila Gomes e Amanda Malini**. Vocês são espetaculares! E, claro, obrigado também ao **Felipe**, o melhor *vídeomaker* que eu poderia ter. Espero que possamos gravar muito mais em novos projetos e, claro, várias novas temporadas do Cachascience.

Camila Gomes, você foi essencial em cada projeto. Aprendi muito com você e nossas milhares de horas de trabalho juntos. Obrigado por sempre tentar me manter no chão, mesmo quando eu tinha as ideias mais mirabolantes, e muitas vezes absurdas.

Obrigado por voar comigo em vários projetos e sonhos que tivemos durante os últimos anos. Você é um exemplo de profissional, uma grande amiga e uma dançarina fantástica.

Até hoje não entendi direito que delírio coletivo foi esse. O delírio que fez com que meu ciclo de amigos mais próximos fossem, majoritariamente, nortenhos (???). Não poderia deixar de agradecer os lindos: **Ivan, Walberson, Andreza, Silvan** e minha namorada **Anaís**. Obrigado por terem compartilhado momentos tão especiais comigo nos últimos anos.

Agradeço também os que sempre estiveram dispostos a me ajudar durante todos esses anos e que tornaram a vida de cientista muito mais fácil e divertida. De fora do lab eu agradeço minhas grandes amigas de graduação **Ana Lidia, Ana Causanilhas** e também, meus amigos de vida **KKKassia, Renatinha, Jecota, Amanda, Catarina, Rebeka, Iarla Patrini, Marcus Alvin, Carol Miranda e Eriks**. Obrigado pelas conversas, cervejinhas, risadas e pelo cuidado. Também agradeço a **Márcia, Raquel, Luiza, Camila, Athayde, Jaque sol, Amanda, Thaty, Henrique, Marmota, Marina Sampaio, Marcela Landim, Alicia, Laise e Malu**. Obrigado por cada brainstorming e cada conversa nos corredores, ou durante os cafés, cada uma delas foi enriquecedora e certamente uma simples conversa de troca de experiências pode ter alterado o rumo de cada delineamento experimental.

Só vocês sabem como é a vida de cientista. O trabalho não para quando acaba o horário comercial, os prazos são insanos e as cobranças mais ainda. Gratidão por todo apoio e o ombro amigo durante os surtos. **Maria**, obrigado pelos banhos de ervas nos corredores dos laboratórios, certamente você deixa a energia do lab mais agradável. Porém, ainda acredito que maior do que as “energias” das ervas, é a sua “energia” que ecoa nos corredores do departamento. Obrigado por todas as risadas e vitalidade que só você tem.

Bruno Iles <3, obrigado por ser tão presente, prestativo e solícito. Obrigado pela companhia do tabaquinho entre experimentos, ou quando estou morrendo de ansiedade. Mas, ninguém é perfeito e espero que um dia você aceite sair para tomar uma cerbecita comigo.

Não posso deixar de agradecer minha irmã científica, rainha da patinação no gelo e princesa do MTT, **Giulia Rosa**. Giulia, como divulgador científico, preciso reconhecer o talento que você tem para ensinar. Didática é dom. Saber ensinar e cativar quem está ouvindo é para poucos. Te ver explicando, com paciência e alegria é revitalizante. Precisamos de mais cientistas assim. Afinal, a ciência precisa sair dos muros dos laboratórios e universidades. Ciência não é feita apenas para que outros cientistas entendam. Obrigado por isso e por cada plaquinha de células que você ajudou a tratar.

Também preciso agradecer quem me ensinou muito sobre privilégios e me fez olhar o mundo de uma forma diferente. Obrigado **Yara Barcellos**, por ter sido tão paciente e presente durante meus anos de doutorado. Não é fácil me fazer acordar 6h da manhã para ir para o crossfit. Mesmo distantes, você terá para sempre um espacinho aqui no meu humilde coraçãozinho. Gratidão!

Tem gente que é tão especial, sabe? Tem pessoas que nos acalmam só de estarem

presentes, amigos que mostram que amor é algo tão grandioso e gratuito. **Camis**, você é uma dessas pessoas, um cristal, um tesouro, um anjinho perfeito. Antes da Spectrum ter CNPJ ou do Voxel Festival se tornar o que é hoje, a Camila já estava comigo. Compartilhando dos mesmos sonhos e ideais. Obrigado, por tudo. Você é um exemplo de profissional e espero o dia que voltaremos a trabalhar juntos. Escrever novos projetos, executar novos projetos e claro, mudar o mundo comigo. Te amo!

Dentre tantos, o meu maior privilégio, sem dúvidas, foi a minha família. O pouco que tenho de humildade aprendi com meu tio **Rafa**, chega a ser chato o tanto que ele ajuda todo mundo (rs). Minha tia **Bruna** me mimou tanto, que eu já comecei a me achar desde pequeno. Amo vocês, titios <3. Meu **Pai** sempre soube de tudo, até hoje fico impressionado com isso. Certeza que puxei dele a vontade de querer fazer de tudo um pouco. Para mim, ele sempre foi a pessoa mais inteligente do mundo todo. Todo mundo fala que somos a cópia um do outro, o que poucos sabem é que não sou filho biológico, mas é esquisito falar “adotado”, isso nunca foi uma grande questão para mim. Estamos em 2022, né? Já sabemos que sangue não significa nada <3. Te amo papai, obrigado por sempre me incentivar a querer ser o melhor.

Mamãe sempre falou que sabia que eu seria cientista. Talvez por eu estragar todos os cosméticos da casa tentando fazer novas fórmulas ou só para ver o que acontecia mesmo. Os sinais eram claros (rs). O curioso é que desde pequeno eu já fazia experimentos com emulsões, seja em cosméticos ou na cozinha. Hoje, continuo fazendo experimentos com emulsões, só que com uma carga teórica um pouco maior (rs). Mainha me teve muito nova, e hoje entendo todos os sonhos que ela abdicou por mim. Mamãe, sou grato por tudo. Obrigado por me dar o que você não teve. Obrigado por trocar os seus sonhos pelos meus. Sei que ser cristã e ter um filho LGBT não é fácil. Obrigado por me aceitar do jeitinho que eu sou. Poucos LGBTs tem esse privilégio. Mesmo depois de três anos sem te ver, sempre bate a vontade de largar tudo e correr para Portugal. Te amo!

A (vovó) **Suzy**, foi minha primeira parceira. Foram muitas fofocas, muitos segredos, muitas aventuras. Eu e ela, ela e eu. Mamãe passava o dia fora e a Suzy era minha segunda mãe. O famoso “criado com vó”. Lembro que todos os dias antes de dormir eu deitava na cama dela e ficávamos rindo até altas horas da noite. Rir até a barriga doer, penso que essas são minhas melhores lembranças. Obrigado por ensinar tanto e obrigado por sempre fazer com que eu me sentisse amado. Até hoje, não sei o que seria de mim sem você. Obrigado por não ter deixado a curiosidade de criança acabar, obrigado por me apoiar e me dar tudo o que precisei, mesmo quando não podia.

Mamãe, Suzy, Papai, Rafa, Bubu, Manu, Ricardo, Davi, Bianca, Pedro e Benjamin. Obrigado por investirem tanto em mim. Tempo, dinheiro, apoio, dedicação, e o principal, obrigado por terem me dado todo o amor que poderiam. Tudo que sou é por vocês. Mesmo que eu atinja meus sonhos mais loucos, vocês sempre estarão lá comigo. E vivo para fazer valer o investimento. Amo vocês!

Para finalizar, não poderia de deixar de agradecer a banca avaliadora. Obrigado, **Dr. Sérgio Moya, Dra. Márcia Cristina, Dra. Luana Camargo e Dr. Ricardo Bentes.** Certamente suas sugestões e experiências são de grande valor para meu trabalho.

“A Ciência é muito mais do que um corpo de conhecimentos. É uma maneira de pensar.”

Carl Sagan

“O maior bem do homem é uma mente inquieta.”

Isaac Asimov

“Todas as vitórias inevitavelmente vêm com um custo.”

Valery Legasov

“Don't stop me now I'm having such a good time.”

Freddie Mercury

RESUMO

As terapias anticâncer atuais muitas vezes carecem de segurança e eficácia, por isso o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra o câncer tem sido foco de inúmeras pesquisas, também em nanotecnologia. A produção de nanopartículas, uma moderna aplicação tecnológica, visa tornar medicamentos mais seguros e eficazes. No entanto, sabe-se que o aumento da produção de nanomateriais para tratamento anticâncer e sua ampla utilização em diversas indústrias aumentam a produção de impurezas, incluindo vestígios de solventes tóxicos e também resíduos de matérias-primas utilizadas. Assim, o presente projeto visa utilizar a nanotecnologia verde para reduzir essas consequências indesejadas, utilizando reagentes comuns, ou de origem natural, na composição de nanocarreadores a serem empregados como alternativa aos fotossensibilizadores já utilizados na terapia fotodinâmica anticâncer. O desenvolvimento do nanocarreador proposto e o fornecimento de informações importantes para o desenvolvimento de protocolos clínicos mais eficientes para a terapia anticâncer agregará valor aos produtos amazônicos, incentivando a conservação da biodiversidade local, uma vez que a região representa hoje uma das maiores potencialidades naturais do Brasil. O objetivo principal da tese foi desenvolver, otimizar, caracterizar e testar a eficácia, *in vitro*, de um carreador lipídico nanoestruturado (NLC) para carregamento de ftalocianina de alumínio (NLC-AIPc). Além de analisar seu potencial para terapia fotodinâmica em modelo murino de melanoma (B16-F10). Além disso, os resultados indicam que foi obtido um NLC natural com baixo custo e boa estabilidade. Ressalta-se que o NLC-AIFtCl foi eficiente por carrear o fotossensibilizador Cloreto de Alumínio-ftalocianina, com excelente atividade fotodinâmica e ausência de toxicidade quando não irradiado. Além disso, os mecanismos biológicos de NLC-AIFtCl na linhagem celular B16-F10 foram analisados. Mecanismos intra-celulares como tempo de internalização pelas células, via de endocitose utilizada pelo carreador e o tipo de morte causado foram indicados. Além disso, o trabalho fornece novas informações sobre melanossomos e melanina, e como estes atuam no tratamento proposto.

Palavras-chave: Melanoma, Carreadores lipídicos nanoestruturados, Terapia fotodinâmica anticâncer

ABSTRACT

Current anticancer therapies are often lacking in safety and efficacy, so the development of new therapeutic approaches against cancer has been the focus of numerous researches, also in nanotechnology. Modern technological application and production of nanoparticles are currently focused on the development of safer and more effective medicines. Nanostructured lipid carriers (NLC) are promising drug release systems. Traditionally, treatment management of melanoma is challenging: the diagnosis is difficult and is often late. Advanced stages of melanoma are characterized by generalized metastases and currently stage IV disease reports survival rates below 10% in 5 years. Conventional treatment for advanced stages such as surgery, chemotherapy and immunotherapy, are effective in cases of non-metastatic melanomas. However, they have limited value for disease when it is disseminated. Thus, it is urgent to study and develop new therapeutic protocols against the disease. PDT has been evident among the scientific community regarding the treatment of solid tumors, considering that it is a noninvasive therapeutic alternative, besides limiting toxic events; and the combination of this with nanomedicine can overcome the disadvantages of numerous conventional anticancer treatments, directing the drug to the site of action and improving its pharmacokinetics, which generates increased treatment safety due to the ability to reach selectively the tumoral tissue. The development of the proposed nanosystem, in addition to providing important information for the development of more efficient clinical protocols for anticancer therapy, will add value to Amazonian products, encouraging the conservation of local biodiversity, since the region represents one of the greatest natural potentialities in Brazil today. The main goal was to develop a third-generation photosensitizer based on aluminium-phthalocyanine (NLC-AIPc) loaded into NLC, and to analyze their potential for photodynamic therapy in melanoma (B16-F10) murine model. Furthermore, results indicate that it was possible to obtain natural NLC with low cost and good stability. It must be emphasized that NLC-AIPc was efficient for carrying aluminium-phthalocyanine photosensitizer, maintaining its photodynamic activity and exhibiting no toxicity in the dark.

Keywords: Melanoma, Nanostructured lipid carriers, Anticancer photodynamic therapy

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema da biogênese do melanossoma	24
Figura 2 – Morfologia de Melanócitos	25
Figura 3 – Representação esquemática da Terapia Fotodinâmica	28
Figura 4 – Formula estrutural e molecular do ácido esteárico (A) e ácido oleico (B).	33
Figura 5 – Vantagens dos NLCs sobre as SLNs	34
Figura 6 – Formas polimórficas de TAGs	36
Figura 7 – Representação de tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados	37
Figura 8 – Principais métodos de preparo de Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados	38
Figura 9 – Representação esquemática de PIT	39
Figura 10 – Características físico-químicas dos lipídeos provenientes do murumuru (<i>Astrocaryum murumuru</i>), o babaçu (<i>Attalea speciosa</i>), o bacuri (<i>Plantonina insignis</i>) e a ucuuba (<i>Virola surinamensis</i>)	42
Figura 11 – Equation 2: Equation of encapsulation efficiency	54
Figura 12 – <i>emph</i> In vitro experimental design	56
Figura 13 – Morphological micrographs of preliminary formulations performed by transmission electron microscopy (TEM)	65
Figura 14 – Pareto graph after analyzing the interaction of variables in the hydrodynamic diameter (HD)	67
Figura 15 – Pareto graph after analyzing the interaction of variables in the polydispersity Index (PDI)	69
Figura 16 – Pareto graph after analyzing the interaction of variables in the zeta potential (PZ)	71
Figura 17 – Analysis of NLC-AIPc by transmission electron microscopy (TEM)	73
Figura 18 – Preparation of NLC-AIPc	74
Figura 19 – Schematic illustration of the developed carriers. NLC-BLANK (A) and NLC-AIPc (B)	76
Figura 20 – Crystallinity profile evaluated by Polarized Light Microscopy. A) Murumuru butter B) Babassu butter C) Bacuri butter D) Ucuuba butter	77
Figura 21 – Normal Raman spectra of samples of the murumuru butter (a), NLC _{BLANK} (b), blank physical mixture (c), physical mixture with phthalocyanine (d) and NLC-AIPc (e).	79
Figura 22 – Spectrum Raman normal of murumuru butter (a), spectrum SERS of the samples AIPc (b), NLC _{BLANK} (c) and NLC-AIPc (d).	80
Figura 23 – Spectral Scan (Absorbance)	81
Figura 24 – Spectral Scan (Fluorescence)	82

Figura 25 – ROS production by the DBF degradation method for the different concentrations of AIPc associated with NLC	83
Figura 26 – Stability of NLS-AIFtCl (room temperature)	84
Figura 27 – Stability of NLS-AIFtCl (4° C)	85
Figura 28 – Stability of NLS-AIFtCl (37°C)	85
Figura 29 – Carrier internalization	87
Figura 30 – Internalization analysis	89
Figura 31 – Endocytosis pathways	91
Figura 32 – Colocalization Analyses	94
Figura 33 – Formation of macropinosomes after exposure to the carrier	95
Figura 34 – Cell viability of B16-F10	96
Figura 35 – ROS production	97
Figura 36 – Morphology Analysis of B16-F10 (TEM and SEM)	98
Figura 37 – Melanosome biogenesis	101
Figura 38 – Cytoskeleton morphology of B16F10	103
Figura 39 – Cell Cycle and DNA fragmentation of B16-F10	105
Figura 40 – NLC-AIPcl-mediated PDT induces apoptosis	107
Figura 41 – Immunogenic response analysis	110

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados	36
Tabela 2 – Variables selected for BB optimization	52
Tabela 3 – Combination of generated independent variables	53
Tabela 4 – Endocytosis inhibitors and their respective inhibition pathways	58
Tabela 5 – HD, Pdl, PZ and EE% values before and after BB optimization	72
Tabela 6 – Results obtained with DSC analysis of butter, AIPc and NLCs	78
Tabela 7 – Legenda	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANOVA	Análise de Variância
ATO	Trióxido de Arsênico
ATP	Adenosina Trifosfato
CLAE	cromatografia a líquido de alta eficiência
CLN	Carreadores lipídicos nanoestruturados
CO ₂	Dióxido de Carbono
DAMP	Moléculas associadas a danos
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindol (Fluoróforo)
DH	Diametro Hidrodinâmico
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSC	Calorimetria diferencial de varredura
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Equal Error
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
ERO	Espécie reativa de oxigênio
EUA	United States of America
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
FS	fotossensibilizador
HD	Hydrodynamic diameter
IC ₅₀	Concentração Inibitória de 50%

IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina 12
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPD	Índice de polidispersão
KV	Kilovoltagem
LAI	Lei de Acesso à Informação
LAS	Alquilbenzeno linear sulfonato
LED	Light Emitting Diode
M1	Ponto de meia aresta da mistura com predominância de brita 1
MA	Measurement and Analysis
MCI	Morte Celular Imunogênica
MDIC	Ministério do Desenvolvimento Indústria e Comércio
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	Microscópio Eletrônico de Varredura
MHC	Complexo Principal de Histocompatibilidade
MTT	Ensaio de captação do corante Tetrazolium (atividade metabólica mitocondrial)
MTX	Mitoxantrona
NIH	National Institutes of Health
PBS	Solução tampão fosfato-salina
PDI	Polydispersity Index
PDT	Photodynamic Therapy
PIT	Phase Inversion Temperature
PTFE	Politetrafluoretileno
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RE	Reticulo Endoplasmático

REED	Redução das Emissões por Desmatamento e Degradação florestal
RNA	Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	Rotação por minuto
RT	Transcrição reversa
SEM	Microscopia Eletrônica de Varredura
SLN	Solid Lipid Nanoparticle
SM	Síndrome Metabólica
T.A	Temperatura ambiente
TA	Tradução Automática
TEM	Microscopia eletrônica de transmissão
TFD	terapia fotodinâmica
UK	Reino Unido (United Kingdom)
USA	United States of America
XX	Século 20
ZP	Potencial zeta
°C	Graus Célsius
ΔH	Variação de Entalpia

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
1.1	Melanoma	21
1.2	Melanina e Melanossomos	21
1.3	Biogênese do Melanossomos	22
1.3.1	Fibrilas PMEL e formação de amilóides fisiológicos	26
1.4	Nanotecnologia superando desafios no manejo do melanoma	27
1.5	Luz, nano, ação: terapia fotodinâmica anticâncer	28
1.6	Tecnologia dos Lipídeos	31
1.7	Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados	33
1.8	Carreadores lipídicos nanoestruturados: um carreador, múltiplas possibilidades.	35
1.9	Métodos de preparação de SLNs e NLCs	38
1.10	O método de temperatura de inversão de fases (PIT)	39
1.11	Nanoestruturas lipídicas baseadas em sustentabilidade	40
2	JUSTIFICATIVA	44
3	OBJETIVO	45
3.1	Objetivos específicos	45
	Aluminium phthalocyanine nanostructured lipid carries: potentialities, sustainability and uses in photodynamic therapy	47
4	ABSTRACT	48
5	INTRODUCTION	49
6	MATERIALS AND METHODS	51
6.1	Materials	51
6.2	Screening of lipids and selection of surfactant	51
6.3	Preformulation study	51
6.4	Box–Behnken (BB) and Optimization of formulation	52
6.5	Evaluation of colloidal properties	53
6.6	Analytical Methodology	53
6.7	Determination of encapsulation efficiency (EE%)	54
6.8	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	54
6.9	Morphology of NLCs	55
6.10	Fourier-Transform InfraRed-FTIR	55

6.11	Raman spectroscopy	55
6.12	Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-SERS	55
6.13	Cell culture:	56
6.14	LED apparatus	56
6.15	<i>In vitro</i> experimental design	56
6.16	Internalization assay and Endocytosis pathways analysis	58
6.17	Cell viability assay (MTT)	58
6.18	Cell viability assay (Crystal violet staining)	59
6.19	DNA fragmentation assay and cell-cycle	59
6.20	Calcium level	59
6.21	Lysosomal membrane permeabilization / Detection of acidic vesicular organelles	59
6.22	Mitochondrial membrane potential and cell morphologic aspects	60
6.23	Cell death assay	60
6.24	B16-F10 cells morphology	60
6.25	Timelapse	61
6.26	<i>In vitro</i> ROS production after NLC-AIPc-PDT	61
6.27	Confocal microscopy – Actin Staining	61
6.28	Western Blotting	62
6.29	ELISA	62
6.30	<i>In vitro</i> differentiation of DCs	62
6.31	Experimental design of co-culture of B16-F10 and dendritic cells	62
6.32	<i>In vitro</i> Lucigenin Bioluminescence Imaging	62
6.33	Statistical analyzes	63
7	RESULTS AND DISCUSSION	64
7.1	Nanostructured lipid carrier (NLC) Preformulation	64
7.2	Optimization of formulation	66
7.3	Characterization of NLC-AIPc	72
7.4	Photo-physical properties	81
7.5	Physical-Chemical Properties	82
7.6	Stability under storage	83
7.7	Carrier internalization, mechanisms of endocytosis and subcellular location	85
7.8	<i>In Vitro</i> tests for the assessment of safety, effectiveness and death analyses	95
7.9	Morphology Analysis of Cells Treated with NLC-AIPc-PDT	97
7.10	NLC-AIPc-mediated PDT induces apoptosis	106
7.11	NLC-AIPc generates reversion of immunosuppression in B16-F10	109

8	CONCLUSION	111
----------	-----------------------------	------------

1 INTRODUÇÃO

1.1 Melanoma

A estimativa do Instituto Nacional de Câncer (INCA) aponta que para cada ano do triênio 2020-2022 ocorrerão 625 mil casos novos de câncer (450 mil, excluindo os casos de câncer de pele não melanoma), reforçando o evidente problema de saúde pública representado pelo câncer no país. Dentre as categorias de câncer, o melanoma acomete somente 3% de todos os tumores malignos relacionados à pele e registrados no Brasil, porém o mesmo apresenta caráter agressivo com prognóstico desfavorável (INCA, 2020).

A ideia de usar a TFD no tratamento do melanoma é antiga. Existem vários estudos experimentais de TFD em modelos de melanoma *in vitro* e *in vivo* que datam de 1996. No entanto, este domínio de investigação começou a desenvolver-se realmente a partir de 2007, favorecido pelo desenvolvimento de fotossensibilizadores e dispositivos de irradiação melhorados. O aspecto mais importante que atrasou o desenvolvimento da TFD antime-lanoma é a resistência desse tipo de câncer. Para entendermos melhor como se dá essa resistência, precisamos falar um pouco sobre a pele e a fisiologia da melanina no melanoma (LLOYD-HUGHES; SHIATIS; PABARI, 2015; AL., 2018a).

A pele humana é repetidamente exposta a várias influências ambientais prejudiciais ao DNA e, portanto, requer vários mecanismos endógenos para proteger, reduzir e/ou reparar esses danos. Esses mecanismos incluem o aumento da espessura epidérmica, mecanismos de reparo do DNA, apoptose, enzimas antioxidantes e, por último, mas não menos importante, a pigmentação da pele. A Radiação UV (RUV) é o principal fator ambiental que influencia a função e a sobrevivência de muitos tipos de células e é considerado o principal fator causador na indução de tumores de pele como carcinoma basocelular (CBC), carcinoma espinocelular (CEC) e melanoma maligno (mel) (BRENNER; HEARING, 2008a; AL., 2018a).

Tradicionalmente, acredita-se que a pigmentação da pele é um importante fator protetor. A melanina, além de absorver UV, possui propriedades antioxidantes e de eliminação de radicais. Além do mais, muitos estudos epidemiológicos têm demonstrado menor incidência de câncer de pele em indivíduos de pele mais escura em comparação com aqueles de pele clara. No entanto, há evidências crescentes de que a relação entre pigmentação e fotoproteção é muito mais complexa do que se supõe. Por exemplo, o fotodano induzido por RUV e seu reparo são sinais que induzem a melanogênese (AL., 2018a).

1.2 Melanina e Melanossomos

A pigmentação da pele depende da síntese e deposição do pigmento melanina na epiderme pelos melanócitos. A melanina, um biopolímero complexo, é formada em organelas especializadas ligadas à membrana, melanossomos, presentes nos melanócitos.

A melanina sintetizada dentro dos melanossomos é transportada *via* dendritos para os queratinócitos adjacentes e se acumula dentro dos queratinócitos e melanócitos na área perinuclear como “capas” supranucleares que supostamente protegem o DNA dos raios UV (SEABRA, 2001a).

A melanina é um pigmento polimérico marrom produzido pelos melanócitos e distribuído por toda a pele, cabelos, olhos e outros tecidos. Desempenha uma função importante na manutenção da homeostase epidérmica. A melanina absorve a radiação UV e dissipa a maior parte da energia absorvida na forma de calor, protegendo assim a pele. Os efeitos fotoprotetores da melanina são evidenciados pela menor incidência de melanoma maligno em pessoas de pele escura em comparação a pessoas de pele clara (SEABRA, 2001a; BRENNER; HEARING, 2008a).

A interrupção do metabolismo da melanina pode causar distúrbios pigmentares da pele, que podem ser congênitos ou adquiridos, temporários ou permanentes, restritos à pele ou sistêmicos e hipo, ou hiper pigmentados. A hiperpigmentação ocorre quando a síntese de melanina é anormalmente aumentada em resposta a certos fatores estimulantes. Pode ocorrer como resultado de reações inflamatórias causadas por fatores fisiopatológicos e físico-químicos, ou como uma alteração intrínseca, ou fotoenvelhecimento da pele (SEABRA, 2001a).

A hipopigmentação ocorre quando a síntese de melanina é anormalmente diminuída por variações genéticas ou epigenéticas, como nos casos de albinismo e vitiligo. Embora os distúrbios pigmentares da pele não sejam fatais, eles podem causar estresse mental e diminuir a qualidade de vida (SEABRA, 2001a).

1.3 Biogênese do Melanossomos

A biogênese dos melanossomos é um processo de várias etapas, que envolve rotas únicas. As etapas iniciais envolvem a síntese da tirosinase no retículo endoplasmático rugoso (RER), uma sequência complexa de reações químicas é iniciada pela conversão de L-tirosina em dopaquinona pela tirosinase onde é empacotada em vesículas e transportada para o Golgi (AKTARY *et al.*, 2021a; RAPOSO *et al.*, 2001; BRENNER; HEARING, 2008a).

Após a formação da dopaquinona, vias distintas de síntese levam à geração das feomelaninas vermelhas e amarelas ou das eumelaninas pretas e marrons. O principal modulador da síntese de melanina e a mudança de eumelanina para feomelanina são fatores intrínsecos e extrínsecos, que regulam notavelmente a expressão gênica de fatores melanogênicos. No entanto, diferentes eventos de endomembranas e tráfego de vesículas em melanócitos também regulam fortemente a produção de melanina e melanossoma (BISSIG; ROCHIN; NIEL, 2016a).

Os melanossomos do estágio I, os melanossomos mais primitivos, são estruturas endossomais precoces ligadas à membrana que iniciam a fibrilação intraluminal de proteínas

pré-melanossômicas (PMEL). As fibrilas PMEL são um componente funcional importante do compartimento melanossomal, pois otimizam a polimerização, condensação e armazenamento da melanina (WATT *et al.*, 2013). PMEL é primeiramente clivado no complexo de Golgi ou em um compartimento pós-Golgi para formar um grande fragmento luminal fibrilogênico. A função desta clivagem ainda permanece indefinida, mas pode modular a conformação PMEL e expor os sítios de interações proteicas. As proteínas melanossomais formam uma rede fibrilar no lúmen do melanossoma, sobre a qual a melanina é eventualmente depositada após sua síntese (BERSON *et al.*, 2003).

Observações de estudos imunocitoquímicos e de fracionamento subcelular sugerem características comuns para melanossomos e endossomos/lisossomos tardios. Estes incluem a presença de vesículas internas como aquelas em corpos multivesiculares, hidrolases lisossômicas e proteínas integrais de membrana, fusão aparente com partículas fagocitadas e um pH ácido (RAPOSO *et al.*, 2001).

Dados de (RAPOSO *et al.*, 2001) mostram ligação direta entre o pré-melanossomo e os compartimentos endocíticos iniciais. Isso é apoiado pela presença de uma fração significativa de Pmel17 em endossomos precoces e revestidos. O endossoma revestido, estruturalmente equivalente ao pré-melanossoma de estágio I, é um precursor de endossoma pós-precoces para pré-melanossomas de estágio II.

As fibrilas de PMEL são totalmente formadas nos melanossomos do estágio II. Os melanossomos do estágio II são caracterizados pela ausência de pigmento e pela presença de fibrilas PMEL organizadas em lâminas paralelas que alongam o compartimento. Após o qual começa a síntese de melanina. Os melanossomas do estágio I aparecem como endossomos multivesiculares vacuolares, e os melanossomos do estágio II existem como formas elipsoidais com aparência estriada devido às fibrilas da PMEL (RAPOSO *et al.*, 2001; WATT *et al.*, 2013).

Na fase III, diferentes enzimas de melanogênese (por exemplo, Tyrp1, Dct) são transportadas e inseridas na membrana do melanossomo para produzir melanina, que se deposita nas fibrilas de PMEL pré-existent. A melanina se acumula nos melanossomos do estágio IV que se tornarão fortemente pigmentados. Nos melanossomos do estágio IV, a síntese de melanina atinge seu paroxismo e resulta no mascaramento completo das fibrilas. Os melanossomos/melanina são então transferidos para os queratinócitos por meio de um processo de exocitose/fagocitose para cumprir seu papel primário na proteção da pele da radiação UV (RAPOSO *et al.*, 2001; WATT *et al.*, 2013).

Antes da exocitose dos melanossomos e da transferência de melanina, os melanossomas devem adquirir uma assinatura secretora através de etapas de maturação que ainda são pouco compreendidas. A maturação é um processo complexo que inclui a desacidificação do lúmen do melanossoma ou neutralização, a aquisição de componentes endossomais específicos pelos melanossomas e a remoção concomitante de proteínas de membrana associadas ao melanossoma (Vamp7 e provavelmente Tyrp1) através da

geração e liberação de túbulos de membrana melanossomal (AKTARY *et al.*, 2021a).

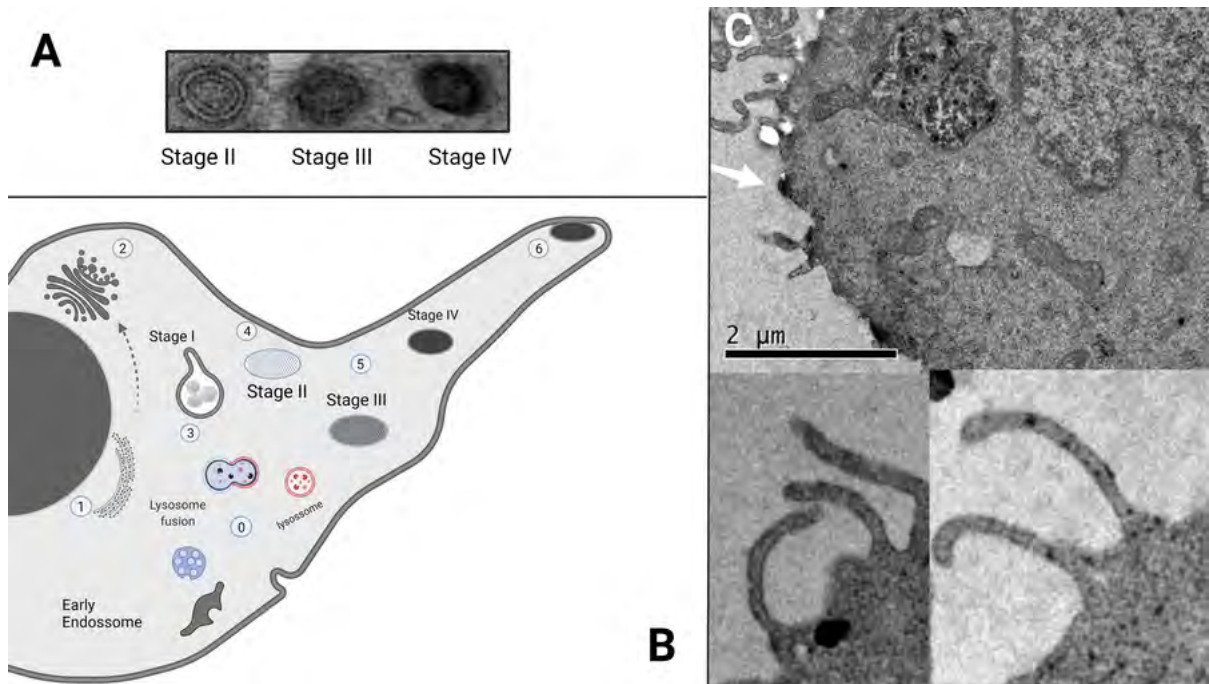


Figura 1 – Esquema da Biogênese do Melanossoma. A) Imagens de microscopia eletrônica de melanossomas nos estágios II, III e IV. B) Representação da biogênese do melanossomo em etapas: (0) Estudos sugerem características comuns para melanossomos e endossomos/lisossomos tardios. Estes incluem a presença de vesículas internas como aquelas em corpos multivesiculares, hidrolases lisossômicas e proteínas integrais de membrana, fusão aparente com partículas fagocitadas e um pH ácido. Além disso, eles implicam um compartimento endossomal revestido de clatrina. (1) As etapas iniciais envolvem a síntese da tirosinase no RER, uma sequência complexa de reações químicas é iniciada pela conversão de L-tirosina em dopaquinona pela tirosinase onde é empacotada em vesículas e (2) transportada para o Golgi. (3) Os melanossomos do estágio I, os melanossomos mais primitivos, são estruturas endossomais precoces ligadas à membrana que iniciam a fibrilação intraluminal de PMEL. (4) O endossoma revestido, estruturalmente equivalente ao pré-melanossoma de estágio I, é um precursor para pré-melanossomas de estágio II, onde as fibrilas de PMEL são totalmente formadas e são caracterizados pela ausência de pigmento e pela presença de fibrilas PMEL organizadas em lâminas paralelas que alongam o compartimento. (5) No estágio III, diferentes enzimas de melanogênese são transportadas e inseridas na membrana do melanossoma para produzir melanina, que se deposita nas fibrilas de PMEL pré-existentes. (6) A melanina se acumula nos melanossomos do estágio IV que se tornarão fortemente pigmentados. Nos melanossomos do estágio IV, a síntese de melanina atinge seu paroxismo e resulta no mascaramento completo das fibrilas. Os melanossomos/melanina são então transferidos para os queratinócitos por meio de um processo de exocitose/fagocitose. Conhecido como modelo filopodia-fagocitose, filopodia, que são extensões estreitas da membrana celular, estendem-se do melanócito e fazem contato com um queratinócito. Os melanossomos são transportados ao longo dos filopódios, que são engolfados pelo queratinócito, e a fagocitose servirá como transporte de melanossomos para os queratinócitos.

À medida que os melanossomas amadurecem, são transportados por proteínas motoras, chamadas cinesinas, ao longo dos microtúbulos do complexo de Golgi até as pontas dos dendritos dos melanócitos. Na ponta do dendrito do melanócito, o melanossoma, via Rab27a, interage com a miosina-Va, que se associa à rede de actina periférica no dendrito do melanócito, como indicado na figura 2 (BOO, 2020).

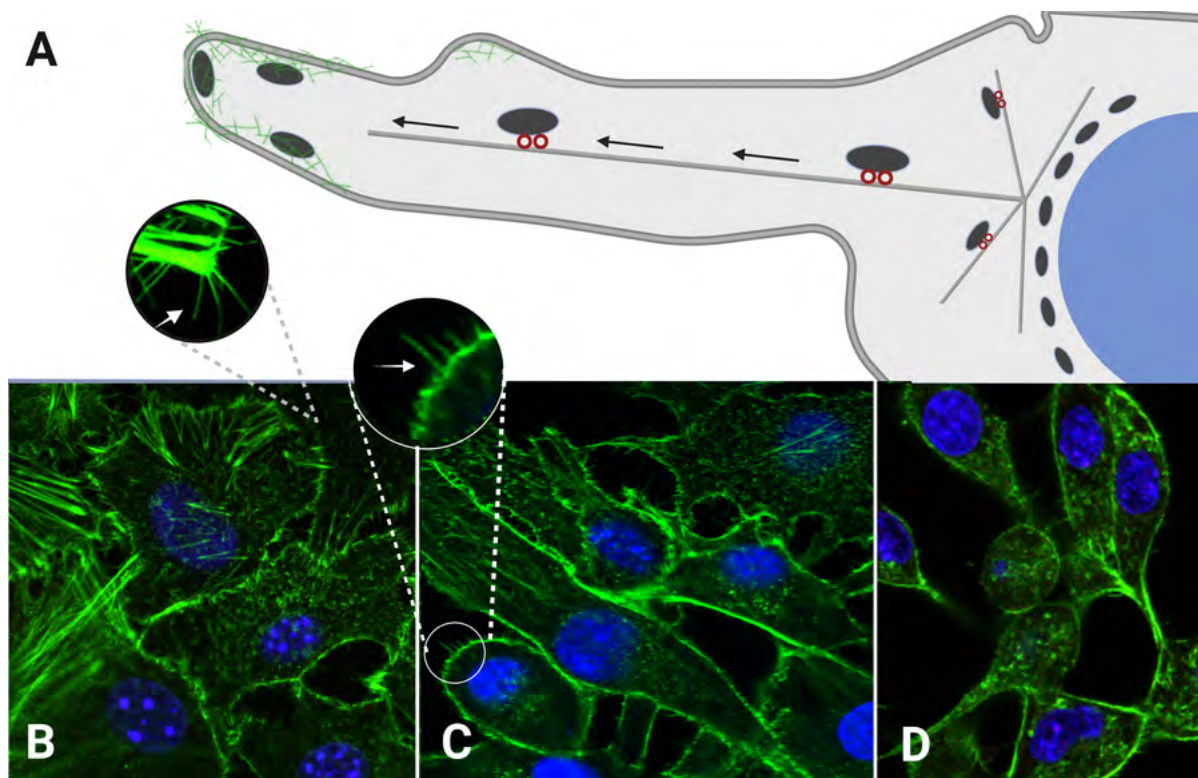


Figura 2 – Morfologia de melanócitos. A) Os melanossomas amadurecem na região perinuclear e ligam-se à cinesina (Círculos vermelhos), um motor de microtúbulos (Traços) direcionado para a extremidade celular. Os melanossomas movem-se ao longo dos microtúbulos em direção à periferia da célula. Uma vez na periferia, os melanossomas se desprendem dos microtúbulos e se ligam aos filamentos de actina através de um motor molecular, a miosina Va. Essa etapa retém os melanossomos na periferia da célula, de onde podem ser transferidos para os queratinócitos adjacentes. B, C e D representam a morfologia do citoesqueleto de melanócitos com foco em filopódios

Em uma extensão desse modelo, conhecido como modelo filopodia-fagocitose, filopódio, que são extensões estreitas da membrana celular, estendem-se do melanócito e fazem contato com um queratinócito. Os melanossomos são transportados ao longo dos filopódios, que são engolfados pelo queratinócito, e a fagocitose servirá como transporte de melanossomos para os queratinócitos (AL., 2019a).

Os melanossomos maduros do estágio IV são transferidos de um único melanócito através de dendritos para o citoplasma de 30 a 40 queratinócitos vizinhos, resultando na disseminação de pigmentos de melanina por toda a epiderme (BRENNER; HEARING, 2008a).

1.3.1 Fibrilas PMEL e formação de amilóides fisiológicos

Os amilóides são caracterizados por uma estrutura quaternária de folha β cruzada e têm sido associados a várias patologias, como a doença de Alzheimer ou a doença de Parkinson. Sua montagem começa a partir de um monômero que se oligomeriza e se monta em fibrilas, que então se organizam em folhas (HAASS; SELKOE, 2007; FERREIRA; VIEIRA; FELICE, 2007).

Embora as fibrilas PMEL sejam fisiológicas e funcionais, sua formação representa um desafio para os melanócitos, pois uma formação e organização incorreta das fibrilas leva à toxicidade celular. Assim, em contraste com os amilóides patológicos, a fibrilação PMEL é fortemente regulada em diferentes níveis para evitar qualquer toxicidade ligada à formação de amilóides. Primeiro, nos melanócitos, a formação de fibrilas é restrita aos melanossomos e isso é garantido por um controle rígido do tráfego, classificação e processamento de PMEL (FERREIRA; VIEIRA; FELICE, 2007).

Em segundo lugar, a cinética da formação de fibrilas PMEL é muito rápida em comparação com a das fibrilas amilóides patológicas. Enquanto os amilóides patológicos precisam de vários dias para se formar *in vitro*, o domínio fibrilogênico PMEL requer apenas alguns minutos. Essa compartimentalização e cinética rápida evitam a agregação de PMEL no compartimento errado e assim, evita o acúmulo de oligômeros amilóides tóxicos (FERREIRA; VIEIRA; FELICE, 2007).

Enzimas melanogênicas que são maturadas através de modificações pós-traducionais no retículo endoplasmático e carregamento de metais no aparelho de Golgi são classificadas e transportadas para melanossomos de estágio II. Depois disso, a melanina é sintetizada e depositada nas fibrilas PMEL dentro dos melanossomos, resultando nos melanossomos do estágio 3 (BISSIG; ROCHIN; NIEL, 2016a)

Nos melanossomos do estágio III, a síntese de melanina é iniciada pela tirosinase por meio da oxidação da L-tirosina em dopa (3,4-dihidroxi-fenilalanina) e da dopa em dopaquinona. Essas etapas são comuns para a síntese de eumelanina e feomelanina, após o que essas duas vias biossintéticas divergem (SEABRA, 2001a). Assim, em melanócitos onde a expressão, tráfego ou conformação de PMEL é afetada, a formação de fibrilas PMEL é comprometida (BISSIG; ROCHIN; NIEL, 2016b).

Mas por que os melanócitos precisam de mecanismos tão complexos para a formação de fibrilas? Não seria mais fácil apenas depositar a melanina no melanossomo? Um possível papel das fibrilas PMEL é atuar como um andaime para intermediários de melanina altamente reativos, que de outra forma se difundiriam livremente dentro dos melanossomos e potencialmente danificariam o conteúdo e a integridade dos melanossomos. Intermediários de melanina sequestrados por fibrilas PMEL polimerizam, o que demonstrou acelerar a síntese de melanina. Assim, as fibrilas PMEL podem proteger os melanócitos da toxicidade associada à síntese de melanina (WATT *et al.*, 2013; BISSIG; ROCHIN; NIEL, 2016a).

1.4 Nanotecnologia superando desafios no manejo do melanoma

Tradicionalmente, o manejo no tratamento do melanoma é desafiador: seu diagnóstico é difícil e muitas vezes é feito tardiamente. Os estágios avançados do melanoma são caracterizados por metástases generalizadas e, atualmente, a doença em estágio IV relata taxas de sobrevida inferiores a 10% em 5 anos. As opções convencionais de tratamento para estágios avançados, como cirurgia, quimioterapia e imunoterapia, embora eficazes em casos de melanomas não metastáticos, são de valor limitado para doença disseminada (LLOYD-HUGHES; SHIATIS; PABARI, 2015).

A quimioterapia em si vem com complicações sistêmicas destrutivas e que são muitas vezes tão extensas que inviabilizam sua utilização no manejo do câncer avançado. A modalidade de tratamento utiliza drogas citotóxicas para destruir células tumorais altamente proliferativas, bem como células normais que são em sua fase de divisão. A principal desvantagem de todos os agentes quimioterápicos é citotoxicidade - eles também matam células normais levando aos efeitos colaterais bem conhecidos como: imunidade reduzida, inflamação gastrointestinal e perda de cabelo. Estes e outros efeitos adversos e as baixas taxas de resposta estão longe do tratamento ideal (LLOYD-HUGHES; SHIATIS; PABARI, 2015; AL., 2018a).

Conforme avanços de pesquisas em todo o mundo e a crescente compreensão das mudanças moleculares e mecanismos do desenvolvimento do melanoma, novas abordagens terapêuticas surgem, alterando positivamente o cenário de tratamento da doença (AL., 2018c). A nanotecnologia objetiva melhorar as abordagens oncológicas adjuvantes para o melanoma, criando sistemas de entrega de medicamentos seguros e eficazes, mas ao mesmo tempo direcionados às células tumorais, sem afetar células normais. A nanotecnologia tem potencial para levar a grandes avanços na área de pesquisa do melanoma, aumentando o arsenal de diagnóstico e tratamento da doença, revolucionando ainda mais a abordagem clínica do melanoma (URBAN *et al.*, 2013).

Os métodos de liberação e carreamento de fármacos podem ser usados não apenas para reduzir os efeitos colaterais sistêmicos, mas também para melhorar a farmacocinética na tentativa de tornar a quimioterapia mais eficaz (KATIPAMULA; MARKOVIC, 2008). Os medicamentos encapsulados em sistemas de entrega são capazes de permanecer na corrente sanguínea por mais tempo, permitindo a liberação sustentada do medicamento, além de fornecer um direcionamento mais preciso ao tumor (HU; ZHANG, 2012).

Para serem sistemas eficazes de entrega de drogas, as nanopartículas são projetadas com múltiplas propriedades: alta afinidade com fármacos, estabilidade no soro humano, propensão a serem atraídas e se ligarem especificamente a células tumorais, por meio de ligantes (ARORA *et al.*, 2012). Alguns nanossistemas têm a vantagem adicional de carrear mais de um fármaco simultaneamente, permitindo assim uma terapia combinada (PARHI; MOHANTY; SAHOO, 2012).

Até o momento, existem apenas quatro sistemas de entrega de medicamentos contra o câncer baseados em nanotecnologia aprovados pela FDA, mas nenhum deles é licenciado para melanoma. No entanto, pesquisas promissoras estão em andamento (LLOYD-HUGHES; SHIATIS; PABARI, 2015).

1.5 Luz, nano, ação: terapia fotodinâmica anticâncer

A terapia fotodinâmica (TFD) surgiu como outra opção terapêutica no tratamento do câncer. A TFD envolve três componentes essenciais: fotossensibilizante (FS), luz (irradiação) e oxigênio. Sua ação decorre da excitação do FS pela luz em um comprimento de onda específico. O FS então forma espécies reativas de oxigênio (EROs) após a interação com o oxigênio molecular, desencadeando efeitos citotóxicos e levando à morte celular por estresse oxidativo, e em tumores sólidos a destruição da microvasculatura tumoral e ativação da imunidade antitumoral (AGHAJANZADEH *et al.*, 2022a). A representação da TFD pode ser observada na figura 1.



Figura 3 – Representação da Terapia Fotodinâmica. Quando o FS é exposto a comprimentos de onda específicos, ele é ativado de um estado fundamental para um estado excitado. Ao retornar ao estado fundamental, ele libera energia, que é transferida para o oxigênio gerando (ROS).

JuanZhang et al. (2018)

Após a absorção de luz (fótons), o FS é transformado de seu estado fundamental singlete em um estado singlete eletronicamente excitado, o qual pode ser convertido ao estado tripleto excitado após o cruzamento intersistemas. O tripleto excitado pode sofrer dois tipos de reações. Primeiro, ele pode reagir diretamente com um substrato, como lipídeos e proteínas, e formar assim radicais (reação do tipo I). Esses radicais podem então interagir com outras moléculas como, por exemplo, o oxigênio. Alternativamente, o tripleto pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio, para formar o oxigênio singlete e, conseqüentemente, EROs (reação tipo II). As reações do tipo II são em geral predominantes em tecidos normóxicos a levemente hipóxicos. Em baixas pressões parciais de oxigênio, no entanto, as reações do tipo I podem ser as mais relevantes. A TFD tende a ser mais

citotóxica quando predominam as reações do tipo II, visto que nestas o fotossensibilizante funciona como um fotocatalisador, diferentemente das reações do tipo I, que envolvem a degradação do fotossensibilizante (fotoclareamento)(JUANZHANG *et al.*, 2018).

A TFD vem se evidenciando entre a comunidade científica no que se refere ao tratamento de alguns tumores sólidos, tendo em vista que se trata de uma alternativa terapêutica não invasiva, além de limitar eventos tóxicos; e a combinação desta com a nanomedicina pode superar as desvantagens de inúmeros tratamentos anticâncer convencionais, direcionando o fármaco ao local de ação e melhorando a sua farmacocinética, o que gera aumento da segurança do tratamento devido à capacidade de atingir seletivamente o tecido tumoral (AGHAJANZADEH *et al.*, 2022a).

A extensão do dano causado e citotoxicidade é multifatorial e depende do tipo de fotossensibilizante, sua localização extracelular e intracelular, a dose total administrada, dose de energia, fluência de luz, disponibilidade de oxigênio e o tempo entre a administração do medicamento e a exposição à luz. Todos esses fatores são interdependentes. As EROs geradas pela TFD podem matar células tumorais diretamente. Ainda, podem danificar a vasculatura associada ao tumor, e ativar respostas imunitárias contra células tumorais (AGHAJANZADEH *et al.*, 2022a; RODRIGUES *et al.*, 2022a).

Entre os FS de segunda geração, destacam-se as ftalocianinas, como o cloreto de alumínio ftalocianina (AlFtCl), as quais absorvem luz entre 660 e 770 nm, possuem alto rendimento quântico de fluorescência para a geração de oxigênio singleto, exibem acúmulo rápido e prolongado em células cancerosas, além de terem tempo de meia-vida reduzido (RODRIGUES *et al.*, 2022a). Fotossensibilizantes de segunda geração, surgem como alternativa aos FS de primeira geração – os quais apresentam limitações em relação a seletividade tumoral, a absorção (em torno de 630 nm) e conseqüentemente baixa penetração de luz nas estruturas celulares alvo, levando a um maior período de fotossensibilização; além de provocar efeitos deletérios ao paciente, como fotossensibilização dérmica prolongada. Por outro lado, os FS de segunda geração apresentam maior seletividade, absorção em uma faixa espectral compreendida entre 650-850 nm e maior eficiência na produção de oxigênio singleto, exigindo menor período de fotossensibilização (RODRIGUES *et al.*, 2022a)(AGHAJANZADEH *et al.*, 2022a) . Na tese, foram usados carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) como um novo sistema FS de terceira geração, dispersível em água para cloreto de alumínio-ftalocianina (AIPc).

Atualmente, as terapias antineoplásicas disponíveis, em sua maioria, associam a remoção cirúrgica com a quimioterapia/radioterapia. Contudo, a taxa de morbimortalidade e de efeitos adversos associados a essas terapias é bastante significativa, principalmente devido à sua baixa seletividade pela massa tumoral. Além disso, grande parte dos fármacos anticâncer utilizados nas quimioterapias convencionais possuem ação não específica, com janela terapêutica bastante estreita, comprometendo a qualidade de vida do paciente. Posto isto, se faz necessária a busca por novas estratégias terapêuticas, dentre as quais

destacam-se as nanotecnológicas, por meio da combinação entre a nanomedicina e a terapia fotodinâmica (TFD) (RODRIGUES *et al.*, 2022a)

Com ênfase na indústria biomédica, especialmente voltada a tratamentos oncológicos, e em congruência com as novas tendências mercadológicas em economia circular e bioeconomia, se faz pertinente com justificativa verossímil o desenvolvimento de nanoestruturas lipídicas para carreamento de fármacos, derivadas de produtos agroalimentares e seu emprego em novas terapias anticâncer (SERRA *et al.*, 2019a; RIBEIRO; SOARES FILHO, 2022a)

Após a absorção de luz (fótons), o FS é transformado de seu estado fundamental singleto em um estado singleto eletronicamente excitado, o qual pode ser convertido ao estado tripleto excitado após o cruzamento intersistemas. O tripleto excitado pode sofrer dois tipos de reações. Primeiro, ele pode reagir diretamente com um substrato, como lipídeos e proteínas, e formar assim radicais (reação do tipo I). Esses radicais podem então interagir com outras moléculas como, por exemplo, o oxigênio. Alternativamente, o tripleto pode transferir sua energia diretamente para o oxigênio, para formar o oxigênio singleto e, conseqüentemente, EROs (reação tipo II). As reações do tipo II são em geral predominantes em tecidos normóxicos a levemente hipóxicos. Em baixas pressões parciais de oxigênio, no entanto, as reações do tipo I podem ser as mais relevantes. A TFD tende a ser mais citotóxica quando predominam as reações do tipo II, visto que nestas o fotossensibilizante funciona como um fotocatalisador, diferentemente das reações do tipo I, que envolvem a degradação do fotossensibilizante (fotoclareamento) (ZHANG *et al.*, 2018; RODRIGUES *et al.*, 2022b).

A TFD vem se evidenciando entre a comunidade científica no que se refere ao tratamento de alguns tumores sólidos, tendo em vista que se trata de uma alternativa terapêutica não invasiva, além de limitar eventos tóxicos; e a combinação desta com a nanomedicina pode superar as desvantagens de inúmeros tratamentos anticâncer convencionais, direcionando o fármaco ao local de ação e melhorando a sua farmacocinética, o que gera aumento da segurança do tratamento devido à capacidade de atingir seletivamente o tecido tumoral (AGHAJANZADEH *et al.*, 2022a).

A extensão do dano causado e citotoxicidade é multifatorial e depende do tipo de fotossensibilizante, sua localização extracelular e intracelular, a dose total administrada, dose de energia, fluência de luz, disponibilidade de oxigênio e o tempo entre a administração do medicamento e a exposição à luz. Todos esses fatores são interdependentes. As EROs geradas pela TFD podem matar células tumorais diretamente. Ainda, podem danificar a vasculatura associada ao tumor, e ativar respostas imunitárias contra células tumorais (MUEHLMANN *et al.*, 2015a).

Entre os FS de segunda geração, destacam-se as ftalocianinas, como o cloreto de alumínio ftalocianina (AlFtCl), as quais absorvem luz entre 660 e 770 nm, possuem alto rendimento quântico de fluorescência para a geração de oxigênio singleto, exibem

acúmulo rápido e prolongado em células cancerosas, além de terem tempo de meia-vida reduzido (RODRIGUES *et al.*, 2022a). Fotossensibilizantes de segunda geração, surgem como alternativa aos FS de primeira geração – os quais apresentam limitações em relação a seletividade tumoral, a absorção (em torno de 630 nm) e consequentemente baixa penetração de luz nas estruturas celulares alvo, levando a um maior período de fotossensibilização; além de provocar efeitos deletérios ao paciente, como fotossensibilização dérmica prolongada. Por outro lado, os FS de segunda geração apresentam maior seletividade, absorção em uma faixa espectral compreendida entre 650-850 nm e maior eficiência na produção de oxigênio singleto, exigindo menor período de fotossensibilização (AGHAJANZADEH *et al.*, 2022a).

Embora a maioria dos estudos com TFD ainda sejam *in vitro* e poucos em ensaios clínicos, a TFD já é atualmente aprovada para o tratamento de patologias tóxicas e vários tipos de câncer. A TFD tem muitas vantagens sobre outras opções terapêuticas (CHIZENGA; ABRAHAMSE, 2020). No entanto, surgiram grandes preocupações com a resistência das células cancerosas à TFD. Há casos em que a TFD pode se tornar ineficaz ou, em casos extremos, desencadear resultados terapêuticos letais, incluindo a propagação do câncer, se administrada incorretamente (EDREI *et al.*, 1998). Nos primórdios dos estudos da TFD, inúmeras questões que trouxeram desafios no uso da TFD foram abordadas e corrigidas ao longo dos anos. Tais problemas incluem a hidrofobicidade do FS, que foi corrigida pela criação de FS associados a nanocarreadores, por exemplo.

Para melanoma, a TFD clássica mostrou algumas desvantagens que limitam sua aplicação clínica. A resistência do melanoma à TFD se deve principalmente à presença do pigmento melanina e dos melanossomos. Vários mecanismos estão envolvidos na suscetibilidade do melanoma à TFD, como: (1) presença de melanina, especialmente em melanomas hiperpigmentados, nos quais a melanina atua como um escudo físico contra a irradiação da terapia e também como um sequestrador de radicais livres, (2) supressão de FS pelos melanossomos, evitando danos por foto oxidação e aumento do efluxo de fotossensibilizadores e (3) acúmulo de defeitos em vias apoptóticas (BALDEA, 2018a)

Assim, potenciais alvos de estudo para a TFD no melanoma são: indução de morte celular, redução do potencial antioxidante, inibição dos mecanismos endógenos de resistência aos medicamentos (MDR) e neoangiogênese, juntamente com a ativação de uma resposta imune anti-melanoma eficiente (BALDEA, 2018a; AL., 2018a)

A TFD obteve uma grande quantidade de benefícios provenientes dos avanços na nanotecnologia. Devido à complexidade das interações farmacológicas e imunológicas envolvidas na TFD, e aos inúmeros relatos sobre resistência à TFD, ideias para modificar o FS, sua eficácia e como ele é entregue ao tecido-alvo usando a nanotecnologia, surgiram. Além disso, embora a maioria dos nanomateriais seja útil apenas como moléculas transportadoras, alguns apresentam propriedades fotoativas que podem ser exploradas para seu uso em TFD (AGHAJANZADEH *et al.*, 2022b).

Na tese, foram usados carreadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) como um novo sistema FS de terceira geração, dispersível em água para cloreto de alumínio-ftalocianina (AIPc).

1.6 Tecnologia dos Lipídeos

Os lipídeos são um grupo diversificado de compostos que possuem muitas funções biológicas importantes, como atuar como componentes estruturais das membranas celulares, servir como fontes de armazenamento de energia e participar de vias de sinalização (GUNSTONE; PADLEY, 1997). O termo “lipídeo” foi definido como qualquer um de um grupo de compostos orgânicos que são insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos. Essas características químicas estão presentes em uma ampla gama de moléculas, como ácidos graxos, fosfolipídios, esteróis, esfingolipídeos, terpenos e outros. Tendo em vista que os lipídeos compreendem um conjunto extremamente heterogêneo de moléculas do ponto de vista estrutural e funcional, não é surpreendente que existam diferenças significativas no que diz respeito ao escopo e organização dos esquemas de classificação atuais (SERRA *et al.*, 2019b; GARTI; SATO, 1988).

Os lipídios são divididos em duas categorias principais, lipídios simples e complexos. Lipídios simples são aqueles que produzem dois grupos de produtos por hidrólise, enquanto os lipídios complexos são aqueles que produzem três ou mais grupos de produtos na hidrólise. Cada uma das categorias simples e complexas é dividida em subcategorias (GUNSTONE; PADLEY, 1997).

Os ácidos graxos podem ser encontrados em óleos e manteigas. Porém, mais comumente os ácidos graxos são esterificados ao glicerol, a esteroides ou outros álcoois, dando origem a radicais acil graxos que fazem parte de lipídeos mais complexos, como os triacilglicerídeos, ésteres de esteroides e ceras. Os ácidos graxos são classificados em curtos, médios e longos de acordo com o comprimento sua cadeia hidrocarbônica. Os ácidos graxos de cadeia curta consistem em menos de 6 carbonos átomos em sua cadeia principal de hidrocarbonetos, ácidos graxos de cadeia média consistem em 6-12 átomos de carbono e os ácidos graxos de cadeia longa consistem em mais de 12 átomos de carbono (GUNSTONE; PADLEY, 1997; SERRA *et al.*, 2019c).

O comprimento da cadeia afeta o ponto de fusão do ácido graxo. Quanto maior o comprimento da cadeia, mais energia será necessária para se para chegar ao estado líquido, assim, o ponto de fusão para lipídeos de cadeia mais longa é mais alto. Além disso, ácidos graxos também podem ser classificados com base em seu número de insaturações, i.e., na quantidade de duplas ligações entre átomos de carbono. Os ácidos graxos podem ser saturados (possuindo apenas ligações simples), monoinsaturados (apenas uma ligação dupla) ou poli-insaturados (mais de uma ligação dupla) (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018a).

Os ácidos graxos saturados têm ponto de fusão mais alto em relação aos insaturados com mesmo comprimento de cadeia hidrocarbônica. Isto decorre do fato de que as insaturações geram inflexões na cadeia hidrocarbônica, tornando o empacotamento dos lipídios mais frouxo, dificultando a sua cristalização e facilitando a sua fusão. Podem ser dados como exemplos dois ácidos graxos bastante frequentes em óleos e manteigas, ambos com 18 átomos de carbono: 1) o ácido esteárico (Fig. 3A) é um ácido graxo saturado e seu ponto de fusão é em torno de 70 °C; 2) o ácido oleico (Fig. 3B) é um ácido graxo monoinsaturado com um ponto de fusão em torno de 15 °C (GUNSTONE; PADLEY, 1997; GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018a).

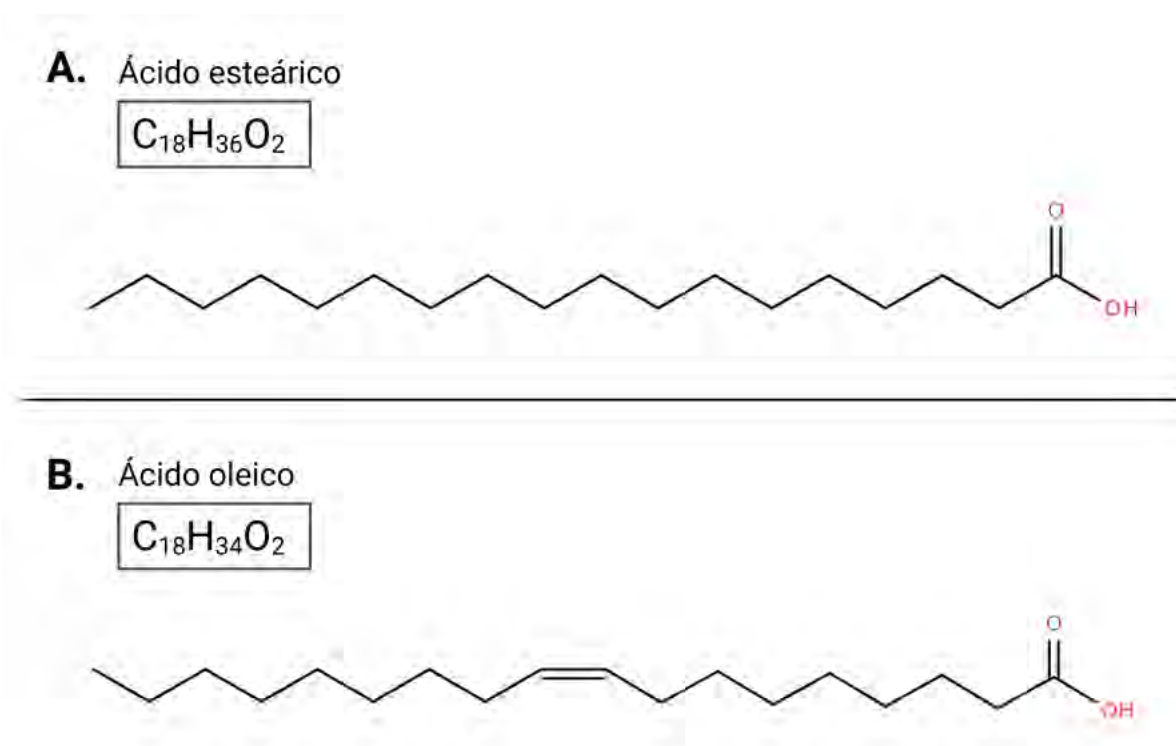


Figura 4 – Fórmula estrutural e molecular do ácido esteárico (A) e ácido oleico (B).

1.7 Nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados

Na década de 80, micropartículas lipídicas sólidas (SLM), preparadas por *spray dryer*, foram descritas pela primeira vez. Posteriormente, dispersões aquosas de nanopartículas lipídicas sólidas (SLN) foram desenvolvidas com lipídios biocompatíveis e biodegradáveis (ELDEM; SPEISER; HINCAL, 1991). SLN possuem uma boa capacidade de carga do ingrediente ativo, possibilidade de encapsular substâncias hidrofílicas e hidrofóbicas com diversas propriedades físico-químicas e farmacológicas e também permitem modular a liberação de substâncias ativas. No entanto, tornou-se evidente que a solidificação e posterior cristalização do lipídeo da fase dispersa na SLN leva à expulsão dos ativos, o que constitui um grave problema de instabilidade. Isso se deve ao fato de que os lipídeos se

crystalizam progressivamente em formas mais estáveis, o que gera um aumento no tamanho das partículas e uma diminuição na capacidade de carga com o passar do tempo (GARUD; SINGH; GARUD, 2012; BELOQUI *et al.*, 2014a).

Para resolver essa instabilidade, um novo sistema coloidal foi desenvolvido a partir de misturas binárias de lipídeos em que parte do lipídeo sólido é substituída por um lipídeo líquido ou uma mistura de lipídeos líquidos, dando origem aos Carreadores Lipídicos Nanoestruturados (NLC), em que o estado sólido da partícula é mantida à temperatura ambiente e corporal. As vantagens da NLC sobre o SLN (Fig. 4) incluem uma maior capacidade de carregamento de ativos, já que grande quantidade dos ativos pode se alojar nas imperfeições da partícula evitando a expulsão precoce do princípio ativo. Da mesma forma, os NLC oferecem maior estabilidade porque não permitem a recristalização de lipídeos sólidos e, assim, o tamanho permanece inalterado durante o armazenamento (BELOQUI *et al.*, 2014b; DAS; NG; TAN, 2012a).



Figura 5 – Vantagens dos NLCs sobre as SLNs

Por outro lado, além da utilização de excipientes totalmente biodegradáveis e biocompatíveis de origem natural, a facilidade de produção em escala industrial torna a SLN e o NLC sistemas de liberação muito atrativos para a indústria. Eles podem ser formulados para direcionamento na entrega de fármacos e também, podem ser administrados por diferentes vias de administração. De fato, eles mostraram potencial em formulações parenterais, e também na administração oral de medicamentos pouco solúveis em água. A aplicação é explicada tendo em vista que durante a digestão podem formar micelas de monoglicerídeos misturadas com sais biliares que ainda podem conter o princípio ativo (YU *et al.*, 2016; DAS; NG; TAN, 2012b). Além disso, a administração dérmica desses carreadores melhora a penetração, tem efeito oclusivo e reduz os efeitos adversos de formulações convencionais. SLN e NLC são adequados para aplicações pulmonares devido à sua baixa toxicidade (MEHNERT; MÄDER, 2012; SCHÖLER *et al.*, 2001).

Embora centenas de trabalhos científicos tenham sido desenvolvidos usando SLN e NLC para a entrega de substâncias ativas pouco solúveis em água e cujos resultados são promissores, ainda há escassos estudos que explicam a organização estrutural desses sistemas, o que é considerado de fundamental importância para entender seu desempenho (DAS; NG; TAN, 2012b).

Em termos gerais, os ingredientes para a preparação de SLN e NLC incluem um lipídio sólido, um lipídio líquido (no caso da NLC), um tensoativo e água, além das moléculas ativas a serem incorporadas. Os lipídios são o principal material estrutural das nanopartículas lipídicas e, portanto, constituem o principal componente da matriz, determinando em grande parte as propriedades desses sistemas coloidais. Usualmente, ácidos graxos livres, álcoois graxos, ésteres de glicerol e ceras são usados. Isso também inclui fosfolipídios, glicolipídios e esfingolípídeos. Além disso, alguns desses lipídios têm uma atividade também de tensoativo que favorece a formação de partículas (DAS; NG; TAN, 2012a).

Os lipídios que constituem os sistemas lipídicos coloidais exibem um comportamento cristalino complexo. A cristalização desses materiais ocorre durante o processo de resfriamento e pode continuar no estágio de armazenamento. Porque a cristalização dos lipídios que compõe a estrutura de SLN e NLC determina a forma da partícula, a incorporação de fármacos e a estabilidade deste tipo de colóides, a compreensão dos fenômenos associados de solidificação e cristalização é fundamental para otimizar as formulações. Consequentemente, atenção especial deve ser dada às transições polimórficas e ao grau de cristalização dos materiais lipídicos envolvidos (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018b).

1.8 Carreadores lipídicos nanoestruturados: um carreador, múltiplas possibilidades.

A maioria dos lipídios em formas farmacêuticas sólidas são triacilglicerídeos (TAGs). Sabe-se que durante o armazenamento a matriz lipídica tende a cristalizar causando a expulsão do fármaco e a mudança de forma dando origem ao crescimento indesejado e

aglomeração das partículas. O controle de transições polimórficas permite formas cristalinas metaestáveis capazes de aprisionar uma quantidade maior de fármaco ou garante que as nanopartículas lipídicas sejam desenvolvidas em formas polimórficas estáveis, nas quais não haverá mudanças significativas durante o armazenamento das dispersões (LOPES *et al.*, 2015).

Portanto, dependendo da composição e do processo de preparação, os lipídios da estrutura interna das partículas podem ter várias conformações como cristais líquidos, géis ou fases lamelares cristalinas. Para TAGs, as formas polimórficas mais comuns são α , β' e β e são representados esquematicamente na Fig. 5. A forma α é metaestável e tem uma subcélula hexagonal (H) com um parâmetro de rede de 0,42 nm; a forma β' tem estabilidade intermediária e empacotamento ortorrômbico perpendicular (O) com parâmetros de rede de 0,42 a 0,43 nm e 0,37 a 0,40 nm. A forma β tem grande estabilidade e é uma forma paralela subcélula triclinica (T) com parâmetros de rede de 0,37 nm, 0,46 nm e 0,39 nm. A forma α tem a tendência de se transformar rapidamente nas formas com melhor empacotamento das cadeias alquílicas. Geralmente, a mistura líquida de lipídios fundidos cristaliza como o polimorfo α e sua transição para o polimorfo β ocorre através do polimorfo β' (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018b).

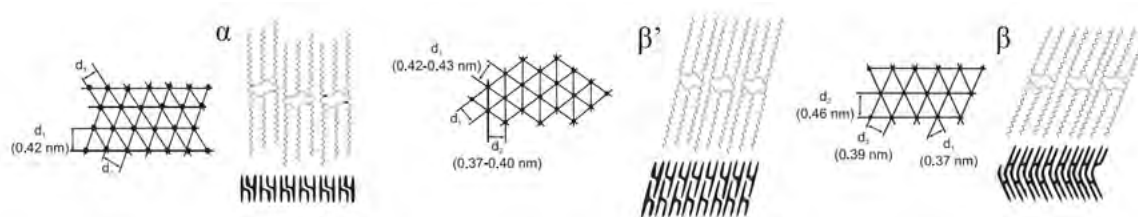


Figura 6 – Formas polimórficas de TAGs

Gordillo-Galeano, 2018

Resumidamente, os tipos de NLCs podem ser categorizados como demonstrado na tabela abaixo:

NLC Tipo I (Imperfeita)	NLC Tipo II (Amorfa)	NLC Tipo III (Múltiplo)
Também pode ser referido como tipo imperfeito. A substituição de uma fração de lipídeo sólido por lipídeo líquido causa a formação de uma rede/matriz cristalina imperfeita. Este fenômeno aumenta a disponibilidade de mais espaço para acomodação do fármaco e permite maior carga de ativos. A formação de um núcleo cristalino imperfeito dá mais espaço para a incorporação de fármacos, evitando a formação de uma matriz altamente estruturada ocasionando a expulsão do fármaco para fora do núcleo.	Também conhecido como tipo amorfo/sem estrutura. A utilização de lipídios sólidos que permanecem na conformação "polimorfo α " após solidificação, quando possui lipídeos líquidos tende a formar um núcleo amorfo. E isso é vantajoso em relação aos NLCs do tipo I, pois não ocorre cristalização e o fármaco permanece incorporado na matriz amorfa. O polimorfo β de lipídios sólidos desenvolve uma matriz estruturada cristalina.	Este é do tipo múltiplo e desenvolvido a partir do conceito de emulsão a/o/a. É basicamente NLC do tipo óleo-em-água, que pode ser desenvolvido apenas pela técnica de separação de fases. Quando o fármaco apresenta maior solubilidade em óleo, esta abordagem pode ser utilizada na formulação de NLCs para melhorar a capacidade e estabilidade de carregamento do fármaco. Pequenas gotículas de óleo são dispersas uniformemente na matriz lipídica sólida e este sistema é disperso no meio aquoso.

Tabela 1 – Tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados
Gordillo-Galeano, 2018

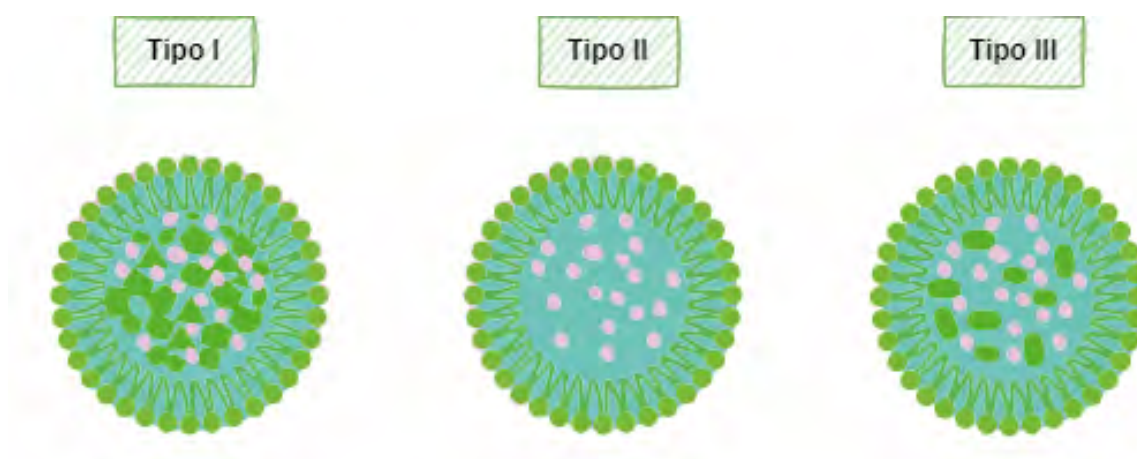


Figura 7 – Representação de tipos de carreadores lipídicos nanoestruturados. Na figura, observa-se na parte externa dos carreadores a representação do tensoativo, circundando todo o carreador. Na parte interna dos NLCs observa-se lipídeos formando uma matriz cristalina (verde) e o fármaco (rosa). No tipo II (Amorfo) é possível observar que não há formação de matriz cristalina.

Assim, três tipos diferentes de NLC foram descritos: (i) o tipo imperfeito, cuja cristalinidade é reduzida pela criação de imperfeições nas redes cristalinas; (ii) o tipo sem estrutura, que é sólido, mas amorfo; e (iii) o tipo múltiplo de Óleo em Gordura em Água

(O/F/W), no qual pequenas gotículas de lipídios líquidos são separadas em fase na matriz sólida (Fig. 6).

As duas técnicas mais utilizadas para determinar o estado físico e estrutura cristalina de SLN e NLC são: Calorimetria Diferencial Exploratória (DSC) e difração de raios X (DRX). A análise de eventos térmicos obtidos pelo DSC fornece informações sobre a estrutura e o estado físico das partículas, bem como a interação entre os componentes (THRANDUR *et al.*, 2009). Da mesma forma, as diferentes transições de fase que ocorrem na amostra podem ser determinadas. Normalmente, o DSC é combinado com medições de DRX para analisar profundamente a estrutura cristalina através do cálculo do espaçamento interatômico. No entanto, a principal desvantagem do DRX é a necessidade de secar as suspensões para tê-las em pó, o que pode originar modificações polimórficas durante o processo. Essa dificuldade pode ser superada pelo uso de espalhamento de raios X, uma técnica capaz de analisar amostras em suspensão (SONODA *et al.*, 2006).

O comportamento cristalino do lipídeo sólido nas partículas é determinado pela composição e pelo tamanho das gotículas de lipídeo fundido. O processo de nucleação pode começar a partir da camada interna ou da camada externa que forma a superfície das nanopartículas. A nucleação dependerá da taxa de resfriamento usada no processo de preparação e os materiais de partida que solidifica primeiro a partir da mistura, por exemplo, lipídeos sólidos, fármacos ou agentes tensoativos (SONODA *et al.*, 2006; WESTESEN; BUNJES, 1995). Dependendo da composição e do método de preparo, os lipídeos da estrutura interna das partículas podem ter várias conformações como cristais líquidos, géis ou fases lamelares cristalinas. Durante o aquecimento ou resfriamento, os lipídeos podem sofrer mudanças estruturais de acordo com sua estrutura química. Além disso, o comportamento físico desses lipídeos está relacionado às características da cadeia hidrocarbônica, a presença de insaturações, e configurações cis ou trans (THRANDUR *et al.*, 2009; ROMERO *et al.*, 2013).

Os lipídios sólidos de baixa massa molecular, incluindo lipídios de grande polaridade e com estrutura anfifílica como diacilgliceróis, monoacilgliceróis, ácidos graxos livres, fosfolipídios e os esteróis podem modular o processo de cristalização dos TAGs desde a nucleação até os eventos após a cristalização. Às vezes, esses lipídeos menores podem promover a cristalização de TAGs, enquanto em outros casos podem produzir um efeito inibidor da cristalização, atribuído a fatores como a concentração de lipídeos na mistura, as diferenças entre os pontos de fusão dos lipídeos e a diferenças na composição química entre os lipídeos da mistura (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018b).

1.9 Métodos de preparação de SLNs e NLCs

Os métodos de preparação de SLN e NLC podem ser classificados em três grupos. Métodos baseados em alta energia, métodos baseados em baixa energia e métodos

baseados em solventes orgânicos (Fig. 7)

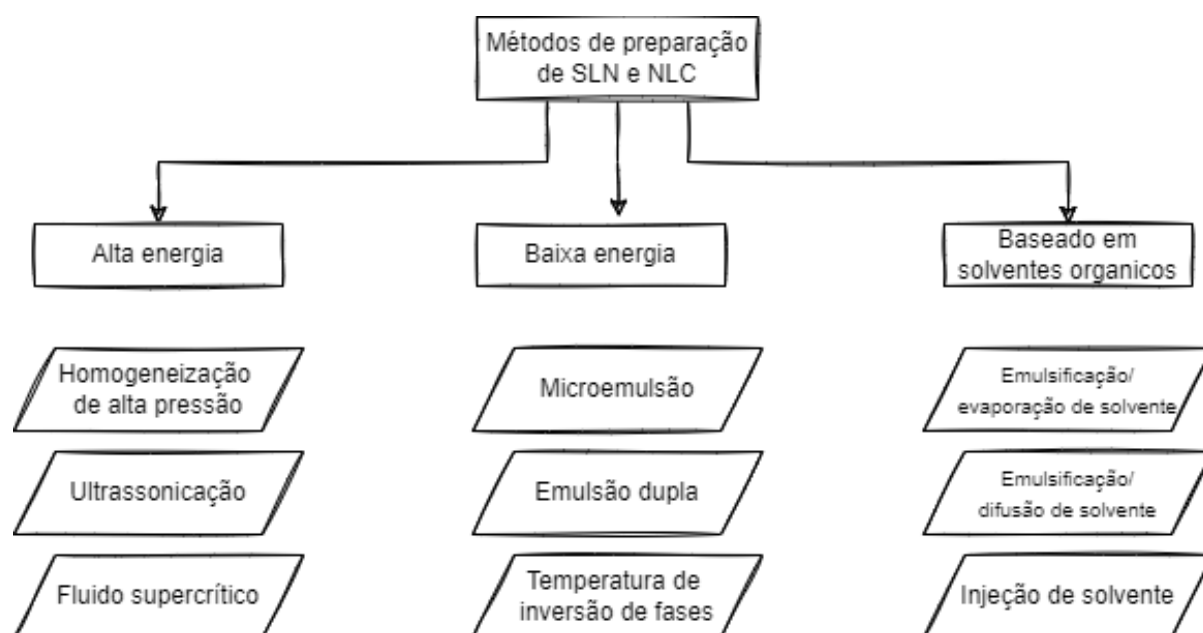


Figura 8 – Principais métodos de preparo de Nanopartículas Lipídicas Sólidas e Carreadores Lipídicos Nanoestruturados

Os métodos baseados em alta energia são aqueles que, em geral, requerem o uso de equipamentos capazes de gerar altas forças de cisalhamento, distorções de pressão ou qualquer outro mecanismo para conseguir a redução do tamanho da partícula. Métodos de baixa energia são aqueles que não consomem grandes quantidades de energia para atingir a redução no tamanho das partículas e alguns podem levar a formação espontânea de partículas nanométricas. Técnicas baseadas em microemulsões, formação de emulsão dupla e temperatura de inversão de fases são alguns dos mais estudados. Os métodos baseados em solventes podem ser de baixa energia ou alta energia (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018a). No entanto, eles são agrupados em uma categoria diferente porque a adição de solventes orgânicos ao sistema é a base para a redução do tamanho das partículas. Isso inclui emulsificação-evaporação de solvente, emulsificação-difusão de solvente e técnicas de injeção de solvente (BELOQUI *et al.*, 2014a; SALVI; PAWAR, 2019).

1.10 O método de temperatura de inversão de fases (PIT)

O método de temperatura de inversão de fases (PIT) foi introduzido por Shinoda e Saito, para a preparação de nanoemulsões. O PIT é definido como a temperatura ou faixa de temperatura na qual as propriedades hidrofílicas e lipofílicas de um surfactante não iônico se equilibram”. O método utiliza a capacidade específica de alguns tensoativos polietoxilados, de modificar suas afinidades por água e óleo em função da temperatura. Na preparação de nanoemulsões pelo método de PIT, o uso de tensoativos específicos leva a

uma inversão da emulsão de macroemulsão O/A (óleo em água) para uma emulsão A/O (água-em-óleo) durante um aumento de temperatura, e posteriormente a formação de uma nanoemulsão O/A durante o resfriamento (CORRIAS; LAI, 2011).

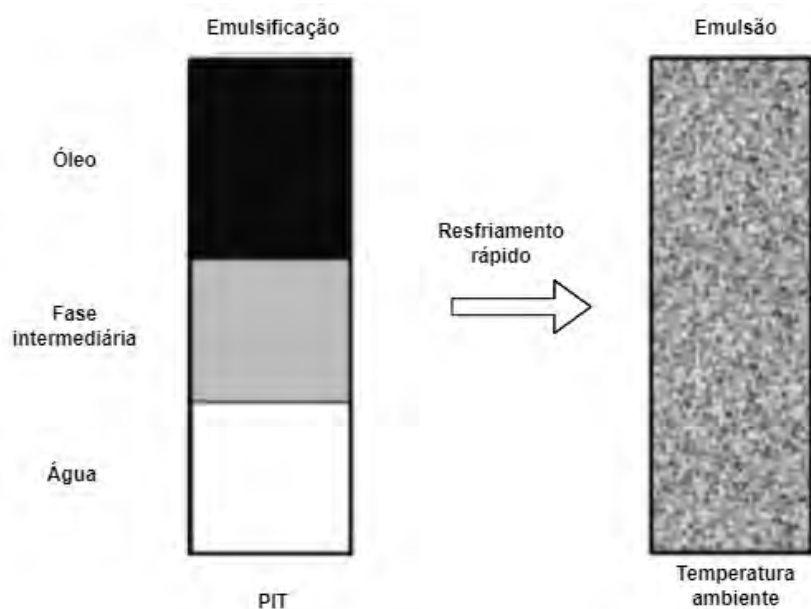


Figura 9 – Representação esquemática de PIT

A parte mecânica do processo ocorre no PIT. PIT é temperatura na qual o sistema contém três fases líquidas: uma fase aquosa (água), que consiste em água praticamente pura, uma fase oleosa com um pouco de água solubilizada, bem como tensoativo dissolvido (óleo) e uma microemulsão bicontínua (fase média). A dispersão mecânica no PIT é seguida por uma redução imediata da temperatura, temperatura na qual a emulsão bifásica formada é caracterizada por um grande número de gotas extremamente pequenas, além das gotas micrométricas formadas na emulsificação mecânica. O método tem ganhado grande popularidade já que é um processo de baixa energia e de fácil escalonamento. Essa atenção deve-se, pelo menos em parte, ao desenvolvimento de inúmeras nanoemulsões utilizando o método, por pesquisadores do mundo todo (CORRIAS; LAI, 2011). O processo é exemplificado na figura 7.

1.11 Nanoestruturas lipídicas baseadas em sustentabilidade

A geração de produtos está condicionada à geração de resíduos. Estima-se, de acordo com a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura – FAO (do inglês Food and Agriculture Organization), que a produção mundial de sub-produtos agroindustriais atinja 1,3 bilhão de toneladas por ano, e que 1/3 dos alimentos potencialmente destinados ao consumo humano é desperdiçado, seja em forma de resíduos oriundos do processamento ou como perda na cadeia produtiva (FAO, 2000a).

A atual cadeia de abastecimento agroalimentar é afetada por diversos problemas de ordem econômica, social e ambiental que a tornam insustentável devido à sua linearidade de exploração. O conceito de economia circular e bioeconomia é de grande interesse para implementar o desenvolvimento agroalimentar sustentável. Este conceito, atualmente, é promovido pela União Europeia para aumentar a competitividade, protegendo as empresas contra a escassez de recursos e ajudando a criar novas oportunidades e mercados inovadores. A economia circular adiciona com um olhar mais amplo e abrangente no design de soluções radicalmente alternativas, ao longo de todo o ciclo de vida de qualquer processo, bem como para a interação entre o processo e o ambiente e a economia na qual está inserido (ASCHEMANN-WITZEL; STANGHERLIN, 2021; FAO, 2000b).

As indústrias de alimentos são responsáveis por gerar toneladas de co-produtos compostos de cascas, sementes e caroços dependendo do tipo de fruta a ser processada. A geração de co-produtos agroindustriais encontra-se em diversas etapas da cadeia produtiva, havendo uma estimativa de que o aproveitamento das matérias-primas vegetais não ultrapasse cerca dos 85% e que os co-produtos gerados possam chegar a 30% (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015)

O reaproveitamento de co-produtos gerados pela agroindústria, que hoje é um dos maiores polos de investimentos, mesmo em países com alto desenvolvimento tecnológico como França e Estados Unidos, tem sido alvo de vários estudos o que contribui para o acúmulo de informações sobre o seu grande potencial e seus valores nutricionais uma vez que os mesmos apresentam uma grande taxa de nutrientes essenciais, que agem no combate contra diversas doenças degenerativas, melhorando a saúde humana (NASCIMENTO FILHO; FRANCO, 2015).

O Brasil apresenta oportunidades interessantes com seu mercado de indústria de processamento de alimentos estimado em 2020 em US \$ 152 bilhões, um aumento de 12,7 % em relação ao ano anterior. Embora a situação econômica do Brasil tenha sido fortemente afetada pelas medidas de distanciamento social da COVID-19, a indústria de alimentos do país manteve sua resiliência e deve crescer em 2022 (Food Processing Ingredients, 2021).

O aproveitamento de co-produtos agroindustriais se mostra, frente ao desperdício de alimentos e ao beneficiamento e processamento destes, como uma grande oportunidade de desenvolvimento de materiais obtidos a partir de subprodutos com maior valor agregado e utilização sustentável dos mesmos. Nesse contexto, o bioma Amazônia, rico em recursos genéticos de fauna e flora, apresenta potencial expressivo no fornecimento de recursos para pesquisas científicas e desenvolvimento tecnológico ((RIBEIRO; SOARES FILHO, 2022a; APPOLLONI *et al.*, 2022)

Dentre estes recursos, as plantas oleaginosas – com destaque para o murumuru (*Astrocaryum murumuru*), o babaçu (*Attalea speciosa*), o bacuri (*Plantonia insignis*) e a ucuuba (*Virola surinamensis*), possibilitam ampla gama de aplicações promissoras nos campos nutricional, agrícola, cosmético e farmacêutico, tendo seus óleos e manteigas,

extraídos de suas sementes, amplamente utilizados (MARQUES *et al.*, 2022; BEZERRA *et al.*, 2022; RIBEIRO; SOARES FILHO, 2022a; SKIRYCZ *et al.*, 2016a). Na tabela a seguir, é possível conhecer um pouco mais sobre as características físico-químicas dos lipídeos derivados dos frutos supracitados.

		MANTEIGA DE MURUMURU	ÓLEO DE BABAÇU	MANTEIGA DE BACURI	MANTEIGA DE UCUUBA
CARACTERÍSTICA	UNIDADE	APRESENTAÇÃO			
Aparência	-	Sólido	Semi-Sólido	Sólido	Sólido
Cor	-	Branco a creme	Amarelo translúcido	Marrom	Marrom
Odor	-	Característica	Característico	Característico	Característico
Índice de Acidez	mg KOH/g	< 15,0	< 7,5	< 30,0	< 15
Índice de Peróxido	meq/1000g	< 10,0	< 10,0	< 10,0	< 10,0
Índice de Iodo	glz/100g	10 - 20	14 - 17	50 - 65	12 - 15
Valor de saponificação	mg KOH/g	230 - 240	240 - 255	200 - 220	220 - 230
Densidade	25°C g/ml	0,9325	0,903 - 0,924	0,921	0,939
Índice de Refração	-	501,4	1148 - 1150	1,475	1,44 - 1,48
Matéria insaponível (bioativos)	%	< 2	< 1	26	< 3
Ponto de Fusão	°C	30 - 35	22 - 26	35	53
COMPOSIÇÃO DE ÁCIDO GRAXO					
Ácido Caprílico (C 6,0)	% peso	< 2,0	4,0 - 6,0	0	0
Ácido Cáprico (C 8,0)	% peso	< 1,0	6,0 - 8,0	0	0
Ácido Láurico (C 12,0)	% peso	40,0 - 50,0	43,0 - 47,0	0	16,0 - 20,0
Ácido Mirístico (C 14,0)	% peso	28,0 - 33,0	15,0 - 19,0	0	72,0 - 76,0
Ácido Palmítico (C 16,0)	% peso	5,0 - 10,0	5,0 - 9,0	67 - 75	7,0 - 9,0
Ácido Palmiteico (C 16,1)	% peso	< 2,0	0	3 - 7	0
Ácido Esteânico (C 13,0)	% peso	2,0 - 5,0	2,5 - 5,5	0	0
Ácido Oleico (C 18,1-Omega 9)	% peso	5,0 - 10,0	12,0 - 16,0	22 - 27	0
Ácido Linoleico (C 18,2-Omega 6)	% peso	10,0 - 5,0	1,0 - 3,0	0	0
Ácido Esteânico (C 13,0)	% peso	0	2,5 - 5,5	0	0
Saturado	%	90	85	75	100
Não saturado	%	10	15	25	0

Figura 10 – Características físico-químicas dos lipídeos provenientes do murumuru (*Astrocaryum murumuru*), o babaçu (*Attalea speciosa*), o bacuri (*Plantonia insignis*) e a ucuuba (*Virola surinamensis*)

Adicionalmente o emprego dos subprodutos das sementes pode também viabilizar, de forma versátil, a obtenção de diferentes tipos de sistemas de liberação de fármacos, a exemplo dos sistemas líquido-cristalinos e nanoestruturas lipídicas, como as nanopartículas lipídicas sólidas e carreadores lipídicos nanoestruturados, devido à complexidade de espécies lipídicas que as compõe. E quando em escala nanométrica, podem apresentar efeitos diferenciados, como aumento da permeabilidade por membranas, bioadesão, liberação controlada, entre outros (GANASSIN *et al.*, 2022a).

Deve-se ressaltar que o avanço da nanotecnologia na indústria traz a preocupação com a sustentabilidade e preservação ambiental. Dessa forma, o desenvolvimento de nanoformulações deve estar em consonância com os princípios da química verde, priorizando a minimização de recursos e processos/etapas de produção, assim como a utilização de reagentes e solventes com toxicidade baixa ou nula, sendo biocompatíveis e biodegradáveis; buscando-se assim, novas tecnologias verdes que cumpram com tais requisitos (APPOLLONI *et al.*, 2022).

No desenvolvimento de nanoestruturas lipídicas podem ser utilizados lipídios biocompatíveis de origem natural, no seu estado sólido ou líquido. Lipídeos sólidos contém mono, di e triacilglicerídeos, ácidos graxos, esteróides e ceras. Os lipídeos líquidos mais comumente usados são triacilglicerídeos com acil graxos de cadeia média, ácido oleico, óleo de soja e óleo de oliva (KHAN *et al.*, 2022a; GANASSIN *et al.*, 2022a) Carreadores lipídicos oriundos da biodiversidade brasileira possuem os requisitos mencionados para a otimização de rotas tecnológicas mais sustentáveis e contribuem, por meio de estratégia tecnológica de inteligência competitiva, com o desenvolvimento social e econômico da região amazônica; transformando a realidade do país de simples exportador de *commodities* para uma economia de exportação de produtos com alto valor tecnológico agregado (RIBEIRO; SOARES FILHO, 2022a; SKIRYCZ *et al.*, 2016a).

2 JUSTIFICATIVA

Embora o uso de nanomateriais no tratamento anticâncer se mostre uma estratégia promissora, sabe-se que aumento da produção de nanoestruturas, bem como seu uso extensivo em várias indústrias aumenta também a produção de resíduos industriais, incluindo resquícios de solventes tóxicos e das matérias primas utilizadas. Assim, o presente trabalho teve como foco desenvolver nanocarreadores produzidos com manteigas vegetais obtidas em sementes de frutos amazônicos. O método de obtenção é inovador, já que utiliza baixa energia, não utiliza solventes orgânicos tóxicos no preparo, é necessária uma quantidade mínima de tensoativo e passível de escalonamento, visando possível fabricação industrial. O uso de lipídeos naturais apresenta a vantagem de menor produção de subprodutos tóxicos para o meio ambiente, facilitando o manejo de resíduos que, em rotas de produção com outras matérias primas, gerariam problemáticas ambientais e empecilhos na produção em larga-escala. Ademais, a preferência por uso de lipídeos da biodiversidade brasileira, como proposto nesta Tese, apoia o desenvolvimento sustentável de regiões brasileiras, incentiva a preservação da floresta amazônica, além de disponibilizar no mercado mundial um produto genuinamente brasileiro, colaborando para um saldo mais favorável ao Brasil no balanço de seu comércio exterior (SINGH, 2022; SKIRYCZ *et al.*, 2016b; RIBEIRO; SOARES FILHO, 2022b)

Desta forma, considerando a necessidade de novas terapias antineoplásicas, as vantagens relacionadas ao uso da nanomedicina e TFD, bem como a potencial aplicação de manteigas naturais para compor NLC, sugere-se que a incorporação de AIFtCl em NLC sustentável, possa otimizar a eficácia desta terapia contra melanoma. O desenvolvimento do nanocarreador lipídico proposto, além de fornecer informações importantes para o desenvolvimento de protocolos clínicos mais eficientes de Terapia Fotodinâmica anticâncer, agregará valor a produtos amazônicos incentivando a conservação da biodiversidade local, já que a região representa uma das maiores potencialidades do Brasil.

3 OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver, otimizar, caracterizar e testar, *in vitro*, carreadores lipídicos nanoestruturados sustentáveis, para cloreto de alumínio-ftalocianina de modo a empregá-los na terapia fotodinâmica antimelanoma.

3.1 Objetivos específicos

Os objetivos específicos da tese foram:

Desenvolvimento

- Realizar estudo de pré-formulação, utilizando metodologia inovadora, simples e sustentável;
- Selecionar, dentre as pré-formulações, o NLC com melhor índice de polidispersividade;
- Otimizar o NLC selecionado, pelo método de Box-Bhenken;

Caracterização

- Realizar a caracterização coloidal das amostras (diâmetro hidrodinâmico médio, índice de polidispersividade e potencial zeta);
- Avaliar as propriedades fotofísicas (espectros de fluorescência e absorbância) e físico-químicas (avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio – EROs);
- Determinar a eficiência de encapsulação;
- Caracterizar o sistema por calorimetria diferencial exploratória, FTIR e RAMAN;

Estudos de eficácia in vitro

- Avaliar *in vitro* a viabilidade celular após tratamento com o NLC-AIPc em modelo experimental de melanoma murino B16F10;
- Avaliar a interação e mecanismos da linhagem B16F10 após exposição ao NLC-AIPc;
- Avaliar a morfologia celular da linhagem B16F10 por microscopia de contraste de fases, de fluorescência, microscopia eletrônica de varredura e transmissão;
- Avaliar alterações em melanossomos e melanina, por microscopias de alta resolução, ocasionadas pelo tratamento com NLC-AIPc, em modelo experimental de melanoma B16F10;
- Analisar o tipo de morte celular desencadeado pela terapia proposta;

-
- Avaliar a morfologia celular (B16F10) por microscopia eletrônica de varredura, de fluorescência e de transmissão;
 - Analisar mecanismos de morte celular desencadeado pela terapia proposta;
 - Avaliar perfil imunogênico desencadeado pela terapia.

**ALUMINIUM PHTHALOCYANINE NANOSTRUCTURED LIPID CARRIES:
POTENTIALITIES, SUSTAINABILITY AND USES IN PHOTODYNAMIC THERAPY**

4 ABSTRACT

Current anticancer therapies are often lacking in safety and efficacy, so the development of new therapeutic approaches against cancer has been the focus of numerous researches, also in nanotechnology. Modern technological application and production of nanoparticles are currently focused on the development of safer and more effective medicines. Nanostructured lipid carriers (NLC) are promising drug release systems. Traditionally, treatment management of melanoma is challenging: the diagnosis is difficult and is often late. Advanced stages of melanoma are characterized by generalized metastases and currently stage IV disease reports survival rates below 10% in 5 years. Conventional treatment for advanced stages such as surgery, chemotherapy and immunotherapy, are effective in cases of non-metastatic melanomas. However, they have limited value for disease when it is disseminated. Thus, it is urgent to study and develop new therapeutic protocols against the disease. PDT has been evident among the scientific community regarding the treatment of solid tumors, considering that it is a noninvasive therapeutic alternative, besides limiting toxic events; and the combination of this with nanomedicine can overcome the disadvantages of numerous conventional anticancer treatments, directing the drug to the site of action and improving its pharmacokinetics, which generates increased treatment safety due to the ability to reach selectively the tumoral tissue. The development of the proposed nanosystem, in addition to providing important information for the development of more efficient clinical protocols for anticancer therapy, will add value to Amazonian products, encouraging the conservation of local biodiversity, since the region represents one of the greatest natural potentialities in Brazil today. The main goal was to develop a third-generation photosensitizer based on aluminium-phthalocyanine (NLC-AIPc) loaded into NLC, and to analyze their potential for photodynamic therapy in melanoma (B16-F10) murine model. Furthermore, results indicate that it was possible to obtain natural NLC with low cost and good stability. It must be emphasized that NLC-AIPc was efficient for carrying aluminium-phthalocyanine photosensitizer, maintaining its photodynamic activity and exhibiting no toxicity in the dark.

Keywords: Green nanotechnology, Nanostructured lipid carriers, Anticancer photodynamic therapy

5 INTRODUCTION

Melanoma arises from the occurrence of genetic mutations in melanocytes, the melanin-producing cells. Although melanoma accounts for only 1% of all malignant skin tumors, malignant melanoma represents the most aggressive and mortal form of skin cancer. (HERSEY; ZHANG, 2001). An important aspect about this disease is the great resistance to treatments. Depending on tumor characteristics (location, stage and genetic profile), therapeutic options may be surgical resection, chemotherapy, radiotherapy, immunotherapy, or photodynamic therapy (PDT). PDT involves three essential components: photosensitizing (PS), light (irradiation) and oxygen. Its action stems from the excitation of the PS by light at a specific wavelength. PS then forms reactive oxygen species (ROS) after interacting with molecular oxygen, triggering cytotoxic effects and leading to cell death by oxidative stress, and the destruction of tumor microvasculature and activation of antitumor immunity (KORBELIK *et al.*, 2015).

However, the classical PDT showed some disadvantages that limit the clinical application in melanoma. Melanoma resistance to PDT is mainly due to the presence of melanin pigment and melanosomes. Considering this, it is necessary to look for new therapeutic strategies, among which nanotechnological strategies stand out, through the combination of nanomedicine and photodynamic therapy (RODRIGUES *et al.*, 2022). Among the second generation of PS, for use in PDT, phthalocyanines stand out, such as phthalocyanine aluminum chloride (AlPc), which absorb light between 660 and 770 nm, have high quantum fluorescence yield for the generation of singlet oxygen, exhibit rapid and prolonged accumulation in cancer cells, besides has reduced half-life time (RODRIGUES *et al.*, 2022). However, a substantial limitation for clinical applications is the low solubility in water, which impairs the administration and efficacy of the drug.

As the researches advance around the world, the understanding of molecular changes and mechanisms of melanoma are developed, new therapeutic approaches emerge, altering positively the treatment scenario of the disease (AL., 2018d). Nanotechnology aims to improve adjuvant oncological approaches for melanoma, including PDT, by creating safe and effective drug delivery systems, for example, drugs with low aqueous solubility, such as AlFtCl, and may also increase selectivity in tumor cells.

In the present study, nanostructured lipid carriers (NLCs) were used as a new third generation PS system, dispersible in water, for The AlPc. The NLCs, the technology chosen for the present work, are colloidal systems on a nanometer scale, consisting of solid and liquid lipids at room temperature, dispersed in an aqueous and medium stabilized by a surfactant (BELOQUI *et al.*, 2014c). Lipid nanostructures normally show high biocompatibility compared to inorganic or polymeric nanoparticles, as well as high colloidal stability and high capacity to carry lipophilic molecules in their oily center. (KHAN *et al.*, 2022b; KOROLEVA *et al.*, 2022; GANASSIN *et al.*, 2022b; MUSIELAK; FELICZAK-GUZIK; NOWAK, 2022).

Studies targets for the application of PDT in melanoma are: 1) studies on cell death induction 2) reduction of the antioxidant potential of melanin/melanosomes, and 3) trigger the activation of an efficient anti-melanoma immune response (BALDEA, 2018b; AL., 2018b). Thus, it must be considered the need for new antimelanoma therapies, the advantages related to the use of nanomedicine and PDT, as well as the potential application of NLCs developed within green nanotechnology. The main goal was to develop a third-generation photosensitizer based on aluminium-phthalocyanine (NLC-AIPc) loaded into NLC, and to analyze their potential for photodynamic therapy in melanoma (B16-F10) murine model. Moreover, to evaluate the mechanisms of death, oxidative stress and activation of the immune system after the proposed treatment.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Bacuri (*Platonia insignis*), Ucuuba (*Virola surinamensis*), Murumuru (*Astrocaryum murumuru*), and Babassu (*Attalea speciosa*) were obtained from Amazon oil, Brazil. FITC Annexin V Apoptosis detection Kit I was purchased from BD Biosciences. Propidium iodide (PI), 1,3-Diphenylisobenzofuran (DPBF), 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Amiloride, Sodium Azide, Cytochalasin, Filipina, Nystatin and Dimethyl sulfoxide (DMSO), were obtained from Sigma, USA. The Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), fetal bovine serum (FBS), penicillin, streptomycin and trypsin was obtained from Gibco, EUA. The 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) was purchased from Invitrogen, EUA. The phosphate-buffered saline (PBS) was supplied by Laborclin, Brazil.

Screening of lipids and selection of surfactant

The selection of the solid lipid was based on the natural lipids that have different fatty acid compositions, aiming to study different types of crystalline events based on the predominant fatty acids. Further, the surfactant was selected based on the solubility of the drug and its ionic nature. In the study of Romero *et al.* (2013) phthalocyanine was incorporated in micelles of 12 different surfactants (ionic surfactant, non-ionic surfactant and the triblock copolymers) the study showed excellent values of DPBF photodegradation and singlet oxygen quantum yields quantum for Brij (non-ionic surfactant). Therefore, natural lipids from Bacuri (*Platonia insignis*), Ucuuba (*Virola surinamensis*), Murumuru (*Astrocaryum murumuru*), and Babassu (*Attalea speciosa*) were chosen as the oil phase and Brij™ O10 was chosen as the stabilizer of the formulation.

Preformulation study

This study was registered in the National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN, Brazil, protocol number A09CC71). The method of obtaining NLC was an adaptation of the phase inversion temperature (PIT). NLC was developed with aluminum-phthalocyanine (AlPc) to select the best preliminary nanostructures. The proportions tested were based on Ganassin *et al.* (2022b) with modifications, using a 1:1 ratio between surfactant and butter corresponding to 5% (m/v) of the formulation containing distilled water. Different proportions of lipids and different ratios of the surfactants to the natural lipids were tested. Briefly, the natural lipid and surfactant were mixed at 60 °C, under magnetic stirring (350 RPM) for 5 minutes. Then, this mixture was diluted with water (1:10, w:v), and the coarse emulsion formed was then heated to 81 °C.

The resultant nanoemulsion was rapidly cooled in an ice bath (0 °C) in order to solidify the lipid matrix and form the NLC-AIPc.

Box–Behnken (BB) and Optimization of formulation

Box–Behnken (BB) is a statistical method widely used for formulation optimization with a reduced number of experiments, with the ability to quantify the relationship between independent and dependent variables (KUDARHA *et al.*, 2015). In this study, BB was used to evaluate the impact of variation between the proportion of butter and surfactant, the AIPc concentration, and the stirring temperature, on the parameters of hydrodynamic diameter (DH), polydisperse index (PDI), and zeta potential (PZ). The development of the formulations was based on the previously mentioned method. The coded values of the variables and the actual values are shown in Table 1. The BB was designed with the help of Minitab Version 18.1 software, generating a total of 15 experiments, containing 3 central points and 3 levels (Table 2). The quadratic equation generated by the model is described below by Equation 1:

$$Y = b_0 + b_1A + b_2B + b_3C + b_4A^2 + b_5B^2 + b_6C^2 + b_7AB + b_8AC + b_9BC$$

(Equation 1)

where Y is the response obtained by measuring combinations of dependent variables; b₀ to b₉ are the regression coefficients of the variables and their interaction terms calculated from the experimental values. A, B, and C are the codes for independent variables, being the proportion of butter and surfactant, AIFtCl concentration, and temperature, respectively.

Independent variables	Levels		
	-1	0	+1
A: Surfactant : Lipid	1:1	1:1,5	1:2
B: AIPc(μM)	20	40	80
C: Temperature (°C)	75°	80°	85°

Table 2 – Variables selected for BB optimization

Number of experiment	A	B	C
1	0	1	-1
2	-1	0	1
3	-1	-1	0
4	0	-1	-1
5	0	0	0
6	0	0	0
7	1	0	1
8	-1	0	-1
9	0	-1	1
10	-1	1	0
11	1	-1	0
12	1	1	0
13	0	0	0
14	1	0	-1
15	0	1	1

Table 3 – Combination of generated independent variables

Evaluation of colloidal properties

The mean particle size and polydispersity index (PDI) of NLC were evaluated at 25 oC by photon correlation spectroscopy and electrophoretic laser Doppler velocimetry (ZetaSizer Nano ZS®, Malvern Instruments, Malvern, UK) with the angle of 90°. Before measurement, samples were diluted with distilled water (1:10, v:v).

Analytical Methodology

AIPc quantification was performed by high-performance liquid chromatography (HPLC) using the Waters™ e2695 instrument. The method developed was based on the one previously described by Muehlmann *et al.* (2015b). The chromatographic condition used consisted of mobile phase 35:75 acidified water 2% (acetic acid) and anhydrous methanol (JTBaker®,

Brazil), chromatographic column Zorbax SB-C8, the flow of 1 mL.min⁻¹, column temperature of 30 °C, and detection at 670 nm using a PDA module. Linearity was measured by developing three analytical curves composed of nine different concentrations of AlFtCl (0.391 μM, 0.781 μM, 1.56 μM, 3 μM, 6.25 μM, 12.5 μM, 25 μM, 50 μM, and 100 μM).

The regression statistics was performed (correlation and determination coefficient), the curve equation was obtained by the least-squares method, and the significance of the angular and linear coefficients was evaluated. Statistical evaluation was performed using one-way ANOVA with $\alpha = 95\%$.

6.7 Determination of encapsulation efficiency (EE%)

The encapsulation efficiency indicates the percentage of added drug that is present in the NLC and to determine this percentage, the indirect method was performed based on the studies by (ARAUJO *et al.*, 2020), with modifications. The samples were centrifuged at 14,000 rpm for 30 minutes, the resulting supernatant containing the nanostructures was collected and diluted in methanol, promoting the disruption of the nanosystem and the release of AlFtCl maintained inside. Subsequently, the formed solution was filtered through a 0.22 μm PTFE filter, and quantification was performed by HPLC using the method previously described. The encapsulation efficiency was calculated according to Equation 2.

$$EE\% = \left(\frac{\textit{Final concentration}}{\textit{Theoretical concentration}} \right) \times 100$$

Equation 2: Equation of encapsulation efficiency

6.8 Differential Scanning Calorimetry (DSC)

DSC analysis was performed using a Q10 DSC calorimeter (TA Instruments) in a nitrogen atmosphere. A heating rate of 10 °C min⁻¹ was adopted, samples weighing around 10 mg and analyzed in alumina crucibles. For this technique, a temperature range of 25 °C to 400 °C was used. The evaluation of enthalpy variation (ΔH) and melting point of the samples murumuru butter, AIPc, NLCBLANK (drug-free nanosystem), NLC-AIPc (suspension with 20 μM of AlFtCl) was performed.

6.9 Morphology of NLCs

The determination of NLCs morphology was performed by transmission electron microscopy (TEM) using the equipment JEOL 1011 (Tokyo, Japan), which was operated at an accelerating voltage of 100 kV. The suspensions were diluted 1:10 (v:v) with Milli-Q® water and deposited directly into the carbon-coated grids used for observation of the samples using an Osmiun contrast. The microscope was operated in bright field mode with magnification above 10,000 times for morphological analysis.

6.10 Fourier-Transform InfraRed-FTIR

Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR-ATR) was used to assess the interactions between functional groups level of the AIPc and the carrier system components. The technique was performed with a Bruker, Vertex 70, equipment with attenuated total reflectance (ATR), with a spectral resolution of 4 cm⁻¹, and 48 scans in the range from 375 to 4500 cm⁻¹. The isolated components, the physical mixture (PM), the NLC, and the NLC-AIFtCl were evaluated.

6.11 Raman spectroscopy

Complementary to the FTIR-ATR, Raman spectroscopy was performed to evaluate the possible interactions between nanoparticle components. The analysis was performed with a resolution of 0.7 cm⁻¹ in the range from 150 to 3200 cm⁻¹ by the LabRam HR Evolution, Horiba, on the isolated components, the physical mixture, the NLC, and the NLC-AIPc. The measure was performed at different wavelengths for different samples: for NLC the analysis was performed at the green line, 532 nm, and for AIPc and NLC-AIPc, the samples were analyzed in the red line, 633 nm.

6.12 Surface-Enhanced Raman Spectroscopy-SERS

Silver films used as substrate for SERS measurements were prepared by electrolytic method using a solution of AgNO₃ (0.1 mg/ml) as electrolyte. Two silver rods (purity ≥ 99.9%) were immersed into the electrolyte as anode and cathode. A direct current was applied to the rods for 1 h, producing a surface nanosilver film. The silver rods were removed from the electrolyte and dried with nitrogen flux.

The samples were excited by the 532 nm line of a diode laser and power of 1 mW. The scattered light was collected using the spectrometer LabRAM HR Evolution (HORIBA Scientific, Palaiseau, France) equipped with an 1800lines/mm grating and Charge-Coupled Device-CCD detector.

6.13 Cell culture:

Murine melanoma cells (B16-F10) were maintained in DMEM supplemented with 10% (v:v) FBS and 1% (v:v) antibiotic solution. Cells were kept in an incubator under a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37°C.

6.14 LED apparatus

A light-emitting diode (LED) system, provided by Prof. Paulo Eduardo Narcizo de Souza, was employed to irradiate cells. The irradiation lasted 10 minutes, at 10 cm of distance and fluence of 25.88 J/cm²

6.15 *In vitro* experimental design

Cells were culture for 24 h at an initial concentration of 3×10⁴ cells per well (96-well cell culture plate), 7×10⁴ (24-well cell culture plate), 1×10⁵ (12-well cell culture plate) and 1×10⁶ (6-well cell culture), then, washed twice with PBS and were exposed to culture medium containing different treatments. The control (unstimulated) consisted of cells that received only culture medium. After that, cells were washed with PBS, cultured for further 15 min, 4h or 24 h, depending on the type of analysis to be performed and finally the analyzes were performed (Fig. 12).

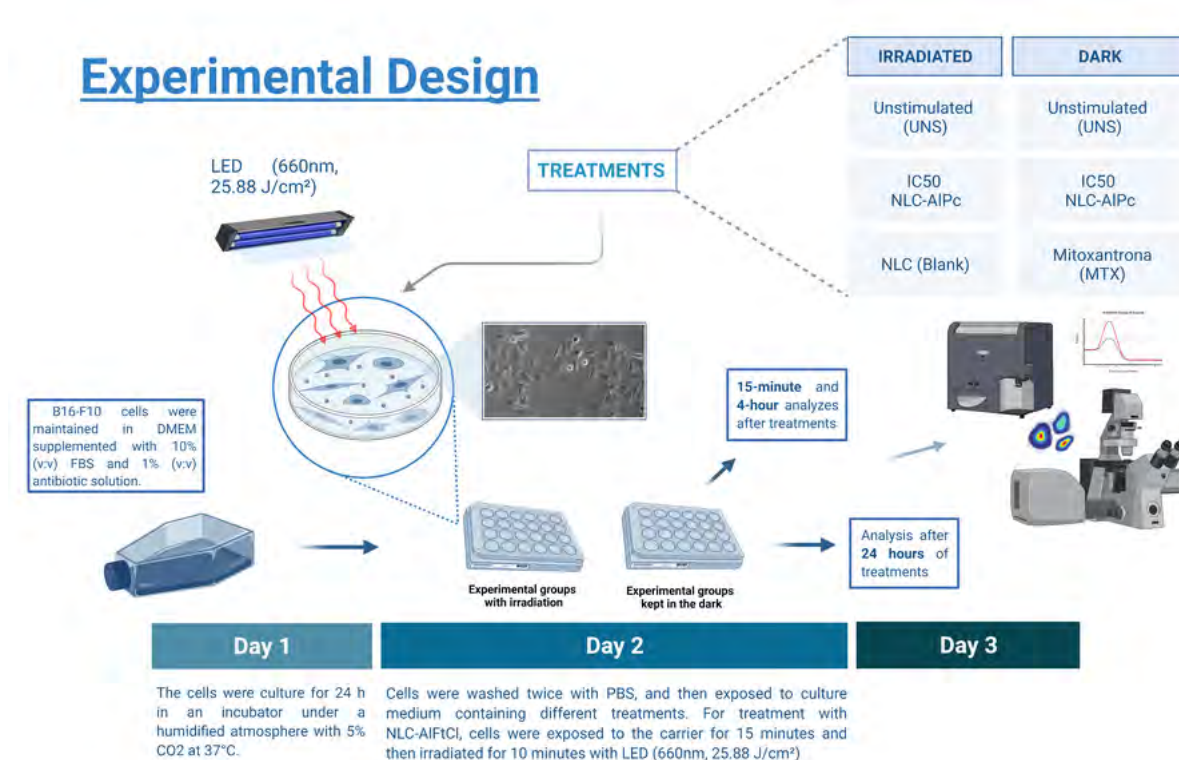


Figure 12 – In vitro experimental design

Cells disposal and culture plates

Experiment	Cells per well	Plate type (/cell culture plate)	Time analysis after treatment
Internalization assay (flow cytometry)	1×10^5	12-well	5 min, 15 min and 30 min
Cell viability assay (MTT)	3×10^4	96-well	24 h
Crystal violet staining	3×10^4	96-well	24 h
Cell cycle	1×10^5	12-well	24 h
Endocytosis pathways	1×10^5	12-well	15 min
Internalization assay (Confocal)	7×10^4	12-well	5 min, 15 min and 30 min
Cell death assay	1×10^5	12-well	24 h
Cellsmorphology(SEM)	7×10^4	24-well	4 h
Cellsmorphology(TEM)	1×10^6	6-well	4 h
<i>In vitro</i> ROS production	7×10^4	24-well	0 min (Fixed right after treatment)
Actin Staining	7×10^4	24-well	0 min (Fixed right after treatment)
Calcium level	1×10^5	12-well	4 h
Detection of acidic vesicular organelles	1×10^5	12-well	15 min, 4 h and 24 h
Mitochondrial membrane potential and cell morphologic aspects	1×10^5	12-well	4 h
Timelapse (phase contrast)	7×10^4	24-well	0 h - 12 h

Experiment	Cells per well	Plate type (/cell culture plate)	Time analysis after treatment
Actin Staining	7×10^4	24-well	15 min
Western Blotting	1×10^6	6-well	24 h
ELISA	3×10^4	96-well	24 h
In Vitro Lucigenin Bioluminescence Imaging	7×10^4	24-well	0 h-15 h

6.16 Internalization assay and Endocytosis pathways analysis

B16F10 cells were plated in 24-well plates and treated with NLC-AIPc, after in 5 minutes, 15 minutes and 30 minutes in dark (no exposure to light) and using endocytosis pathway inhibitors. After exposure cells were washed and was analyzed by flow cytometry (FACSkalibur) and using FL1 channel.

Inhibitor	Concentration	Inhibition Pathway
Sodium azid	100 mM	ATP-dependent pathways
Amiloride	0,2 mM	Macropinocytosis
Cytochalasin D	1 μ M	Pinocytosis
Phenylarsine	0,2 μ M	Clathrin-mediated pathway
Nystatin	20 μ g/mL	Caveolin-mediated pathway

Endocytosis inhibitors and their respective inhibition pathways

6.17 Cell viability assay (MTT)

The cells were treated, then exposed to 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (0.5 mg/mL in culture medium), as previously described. Next, the MTT solution was removed, the cells were washed with PBS, and the formazan formed by viable cells was extracted with 200 μ L DMSO. The absorption at λ 595 nm was then measured using a spectrophotometer (SpectramaxM2; Molecular Devices LLC). This experi-

ment was performed in sextuplicate for each treatment, and the results were expressed as percentages relative to control. Two-way ANOVA was performed with Bonferroni posttest, for comparison between treatments and concentrations at different times, the analysis of the repeatability of the data by the calculation of the Intraclass Correction Interval at 95% by means of the program GraphPad prism version 8.0.

6.18 Cell viability assay (Crystal violet staining)

B16F10 cells were plated in 24-well plates and treated with NLC-AIPc, after 24 hours of stimulation cells were fixed with 4% of Paraformaldehyde and stained with 0.05% crystal violet solution for 30 min after waxes spectra were measured at an excitation wavelength of 570 nm using a multimode Microplate Spectrophotometer (SpectraMAX M3).

6.19 DNA fragmentation assay and cell-cycle

Cell cycle analysis was carried out by staining the DNA at different stages with propidium iodide (PI), determined by flow cytometry. The B16-F10 cells were exposed to for culture medium containing different treatments. Cells were washed with PBS and trypsinized, then harvested and centrifuged. The pellet was washed in PBS, fixed in ethanol (70%) at 4 °C. Then, cells were stained with propidium iodide solution consisting of 45 mg/mL PI, 10 mg/mL RNase A, and 0.1% Triton X-100. After 1 h of incubation at 37 °C in a CO₂ incubator, flow cytometry analysis was performed using FACSCalibur (BD Biosciences Co., Franklin Lakes, New Jersey, USA). The data were analyzed using FlowJo single cell analysis software.

6.20 Calcium level

Intracellular calcium level was evaluated using fluo-4 AM staining. Acetoxymethyl ester (AM) is cleaved inside cells and release free fluo-4 as a green fluorescent calcium indicator. The cells were exposed to 2 µL of fluo-4 AM for 30 minutes at room temperature protected from light. Intracellular calcium measurement was performed by flow cytometer (BD FACSVerser TM, USA) using FITC channel. A total of 10,000 events were collected per sample.

6.21 Lysosomal membrane permeabilization / Detection of acidic vesicular organelles

Acridine orange (AO) is a lysosome-tropic metachromatic fluorochrome. When excited with blue light, AO emits red fluorescence at high concentrations when it is present in lysosomes. Cells were exposed to 50 µM of AO for 30 minutes protected from light at room

temperature. After time incubation, the lysosomal membrane permeabilization and AVOs were analyzed by flow cytometer (BD FACSVerserTM, USA) using PI channel. A total of 10,000 events were collected per sample.

6.22 Mitochondrial membrane potential and cell morphologic aspects

The mitochondrial membrane potential analysis was performed to evaluate mechanism associated with apoptosis, using Rhodamine 123, a cationic fluorescent probe able to accumulate specifically in the mitochondria due to the negative transmembrane potential in this organelle in living cells. Cells were washed twice in PBS, and then 300 μ L of Rhodamine 123 (5 μ g/mL in PBS, Thermo Fisher, USA) were added to each sample and incubated for 15 minutes at room temperature, protected from light. Then, cells were washed twice with PBS and analyzed by a flow cytometer (BD FACSVerserTM, USA) using FITC channel. A total of 10,000 events were collected per sample. Parameters related to the size and granularity of treated cells were obtained by flow cytometry (BD FACSVerserTM, USA) using FSC and SSC channels, respectively. A total of 10,000 events were collected per sample.

6.23 Cell death assay

B16F10 cells were plated in 24-well plates and treated with NLC and NLC-AIPc, after 24 hours of stimulation cell death was analyzed by flow cytometry (FACSkalibur) and using FITC Annexin V and Propidium Iodide .

6.24 B16-F10 cells morphology

In order to evaluate the B16-F10 morphology, the scanning electron microscopy (SEM) and TEM were performed as described (da Rocha et al, 2020). Briefly, for SEM, the cultured B16-F10 cells were fixed using the Karnovsky solution (2% glutaraldehyde, 2% paraformaldehyde and 3 % sucrose in sodium cacodylate 0.1M pH 7.2) overnight. Then, the cells were washed with sodium cacodylate (0.1 M) and fixed with osmium tetroxide for 30 min. Finally, samples dehydration gradient of acetone (30-100%) was performed, then, samples were the critical-point-dried (Balzers, CPD 030, Germany), gold-sputtered and analyzed. For TEM, B16-F10 cells were fixed using the same protocol as mentioned above. Then, samples were counterstained for 12 hours with 0.5% uranyl acetate at 4 °C and a dehydration gradient of acetone (30-100%) was performed. Finally, the samples were embedded in Epon resin and ultra-thin sections (50-70nm) were obtained with diamond knives in an ultramicrotome. The sections were mounted on copper screens and analyzed using a TEM (JEOL 1011, Tokyo, Japan) operated at an accelerating voltage of 100 kV.

6.25 Timelapse

The Evos FL Auto 2 (Thermo Scientific) was used to take images every 5 min for 12 hr. Between images, the sample plate was kept in a 37 °C incubator.

6.26 In vitro ROS production after NLC-AIPc-PDT

B16-F10 cell line were plated and grown for 24h at 37 °C. Then, cells were treated with NLC-AIPc-PDT. The ROS sensitive spin probe CMH (stock solution of 10 mM prepared with KHB, which contains 25 μ M DF and 5 μ M DETC to minimize the oxidation of CMH by Fenton reaction because of transition metals) was added to a final concentration of 250 μ M in 600 μ L cell culture medium before the irradiation with LED 660 nm. Then, cells were irradiated for PDT. Following this, 450 μ L of supernatant was transferred to a 1 mL decapped syringe and snap frozen in liquid nitrogen. All the samples were stored at a 80 °C freezer until the EPR measurements were performed. EPR measurements were carried out in a Bruker spectrometer (Bruker EMXplus, Germany), equipped with an X-band (9 GHz) high sensitivity cavity (Bruker ER 4119HS, Germany). For ROS detection, samples were transferred to a liquid nitrogen dewar (Noxygen, Germany) and the spectra were recorded at 77K. The equipment settings were 2 mW microwave power, 5 G amplitude modulation, 100 kHz modulation frequency and 200 G sweep width. The peak to peak amplitude was employed for detection of the signal. A calibration curve was obtained using the nitroxide radical (CP \cdot) diluted in KHB to the following concentrations: 0, 10, 50, 100, 250 e 500 μ M. In this concentration range, a linear calibration curve was obtained and all the recorded data were within this calibration range.

6.27 Confocal microscopy – Actin Staining

In order to evaluate the B16-F10 cell structure, an actin staining protocol was performed. Briefly, Cells were fixed with 3.7% paraformaldehyde for 15 min, washed with PBS (phosphate buffer saline) and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 20 min. to avoid nonspecific antibody binding, B16F10 cells were incubated with blocking Solution (2.5%) containing Bovine serum albumin (BSA), 8% Fetal bovine serum and PBS) and washed with PBS. Finally, a conjugate phalloidin-Alexa Fluor® 488 working solution (3:40) then DAPI (300nM) was added. DAPI and Alexa Fluor® 488. The slides were mounted with ProLong Gold Antifade and the image analysis was made in the Confocal microscopy Leica TCS SP5 (Leica Microsystems, Westzlar, Germany) using appropriate excitation/emission (ex/em) filter (The ex/em peaks of DAPI and Alexa Fluor® 488 are respectively 350 nm/465 nm and 490 nm/525nm).

6.28 Western Blotting

The proteins were extracted using lysis buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, EDTA 5mM and Triton-X100 1%) and Cocktail Protease Inhibidor (04693159001, Roche). The gel contained 12% of Polyacrilamide, the transfer occurred using a dry system. The membrane was blocked for 1 hour and incubated overnight at 4 °C with the primary antibody (Anti Bax, B3428 – Sigma Aldrich; Bcl2, MA5-11757 - ThermoFischer; Caspase 3, ab13847, Abcam. The membrane was then incubated for 1 hour with a rabbit secondary antibody (111-035-006, Jackson Immuno Research). The loading control used was anti Beta actin antibody (A3854, Aldrich). The bands were revealed using Chemiluminescent Substrate (Westar Supernova XLS3L and XLS3P) by Image Quant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences). The bands were analyzed with the ImageJ software (Version 1.8).

6.29 ELISA

After 24 hours of treatment, the secretion of IL-1 β was accessed by Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) following the recommendations of manufacturer (BD Biosciences) and analyzed by spectrophotometry at 450 nm. The concentration of each cytokine was plotted in absolute values (pg/mL) using GraphPad Prism Version 6.00.

6.30 In vitro differentiation of DCs

Purified bone marrow monocytes were cultured at 1×10^6 cells/mL in 24-well plates in the presence 25 ng/mL GM-CSF. Culture medium was RPMI 1640 with 10% fetal calf serum (FCS), 50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME), and 100 U/mL penicillin-streptomycin.

6.31 Experimental design of co-culture of B16-F10 and dendritic cells

Cells B16F10 were culture for 24 h at an initial concentration of 7×10^4 (24-well cell culture plate), then, washed twice with PBS and were exposed to culture medium containing different treatments. The control (unstimulated) consisted of cells that received only culture medium. After that, cells were washed with PBS, cultured for further 4h and then 500 microliters of immature dendritic cell suspension (7×10^4 cells) was added to each well containing treated or untreated B16-F10 cells. Then the plates were taken to the Bioluminescence Imaging.

6.32 In vitro Lucigenin Bioluminescence Imaging

Lucigenin (2.5 mg/ml) stock solutions were prepared in saline solution. Cells were exposed to 1:20 (v:v) lucigenin stock solution in DMEM culture medium. After exposure,

plates with co-culture of B16F10 cells and dendritic cells were imaged using the IVIS Lumina imaging system (Caliper Life Sciences, Hopkinton MA). Serial bioluminescence images were acquired for 5 min with F/stop = 1 and binning = 8. During the first hour, an image was taken every five minutes. During the next 14 hours, one image was taken every hour. Bioluminescence images were presented as radiance in photon/sec/cm² /sr with minimal and maximal thresholds indicated. We used the Living Image software package (version 4.2, Caliper Life Sciences) to calculate peak total bioluminescent signal through standardized regions of interest (ROIs).

6.33 Statistical analyzes

Data were analysed with GraphPad Prism® version 6.0 software (GraphPad Software, La Jolla, CA). Significant differences between data sets were assessed by one-way or two-way ANOVA, with Tukey's or Sidak's post-tests ($\alpha= 0.05$). Quantitative results were expressed as mean \pm standard error of the mean or mean \pm standard deviation oh the mean.

7 RESULTS AND DISCUSSION

7.1 Nanostructured lipid carrier (NLC) Preformulation

NLC was subjected to hot emulsification under magnetic stirring. The melting points of murumuru, babassu, bacuri and ucuuba butters were visually observed. All natural butters showed complete melting at a temperature of 70 °C, demonstrating their eligibility for the development of NLC. The macroscopic analysis of the formulations studied revealed the characteristic Tyndall effect of colloidal suspensions. After macroscopic analysis, the formulations were analyzed for their colloidal characteristics and morphology (TEM), which are displayed in table 4 and Fig. 13, respectively.

Table 4 – NLC formulation with BrijO10

Sample	HD (nm)	PDI	ZP (mV)
CLN Murumuru	27,53 ± 0,230	0,191 ± 0,001	-11,80 ± 2,600
CLN Babaçu	100,6 ± 0,20	0,266 ± 0,005	-10,4 ± 0,153
CLN Bacuri	536,4 ± 49,85	0,600 ± 0,039	-22,3 ± 1,18
CLN Ucuuba	140,8 ± 2,718	0,526 ± 0,006	-21,6 ± 0,115

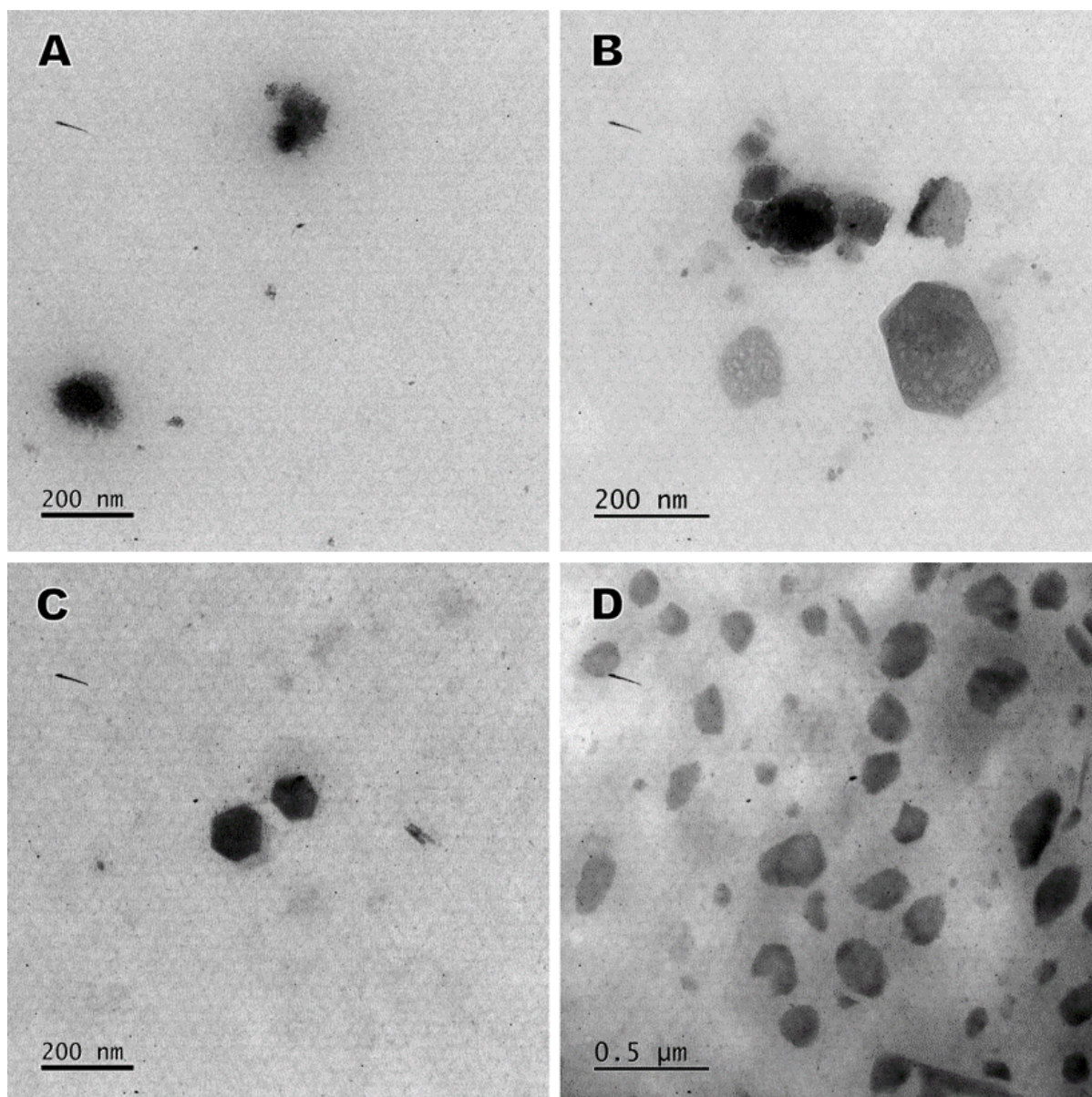


Figure 13 – Morphological micrographs of preliminary formulations performed by transmission electron microscopy (TEM)

PDI is a parameter that indicates the size heterogeneity of a population of particles in suspension. Monodisperse nanosuspensions present low PDI, which is an indicative of lower susceptibility to destabilizing events, such as Ostwald ripening (ALI *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2017). Based on the PDI, murumuru NLC was chosen as the carrier for aluminum-phthalocyanine. It is suggested that the differences found in HD and PDI between the NLC formed with different butters stem from the difference in lipid composition between them since natural butters are complex mixtures of triacylglycerides. These differences impact, for instance, their melting point and crystallinity profile (CAMPOS; MARANGONI, 2010; GOMES *et al.*, 2019). Thus, the NLC murumuru sample containing AIPc was selected for optimization.

7.2 Optimization of formulation

To optimize the colloidal characteristics of NLC, an experimental BB design was carried out, varying the proportion between surfactant and butter, drug concentration, and temperature variation. The effect of combination of these independent variables on the dependent variables (HD, PDI, and PZ) can be observed below.

The HD of the nanoparticles varied between 16.96 nm (experiment 11) and 44.52 nm (experiment 3). The effect of independent variables and factors on HD is demonstrated by Equation 3:

$$\text{HD} = 19,72 - 9,61A + 6,35B + 2,50C + 7,91A^2 + 9,98B^2 + 1,62C^2 + 0,59AB - 6,66 AC - 1,53 BC \text{ (Equation 3)}$$

The value of the correlation coefficient (R²) for Equation 3 was 0.94, indicating a good value. The Pareto graph, the effects graph of measures and the response surface obtained by the interactions between variables can be seen in Figure 14.

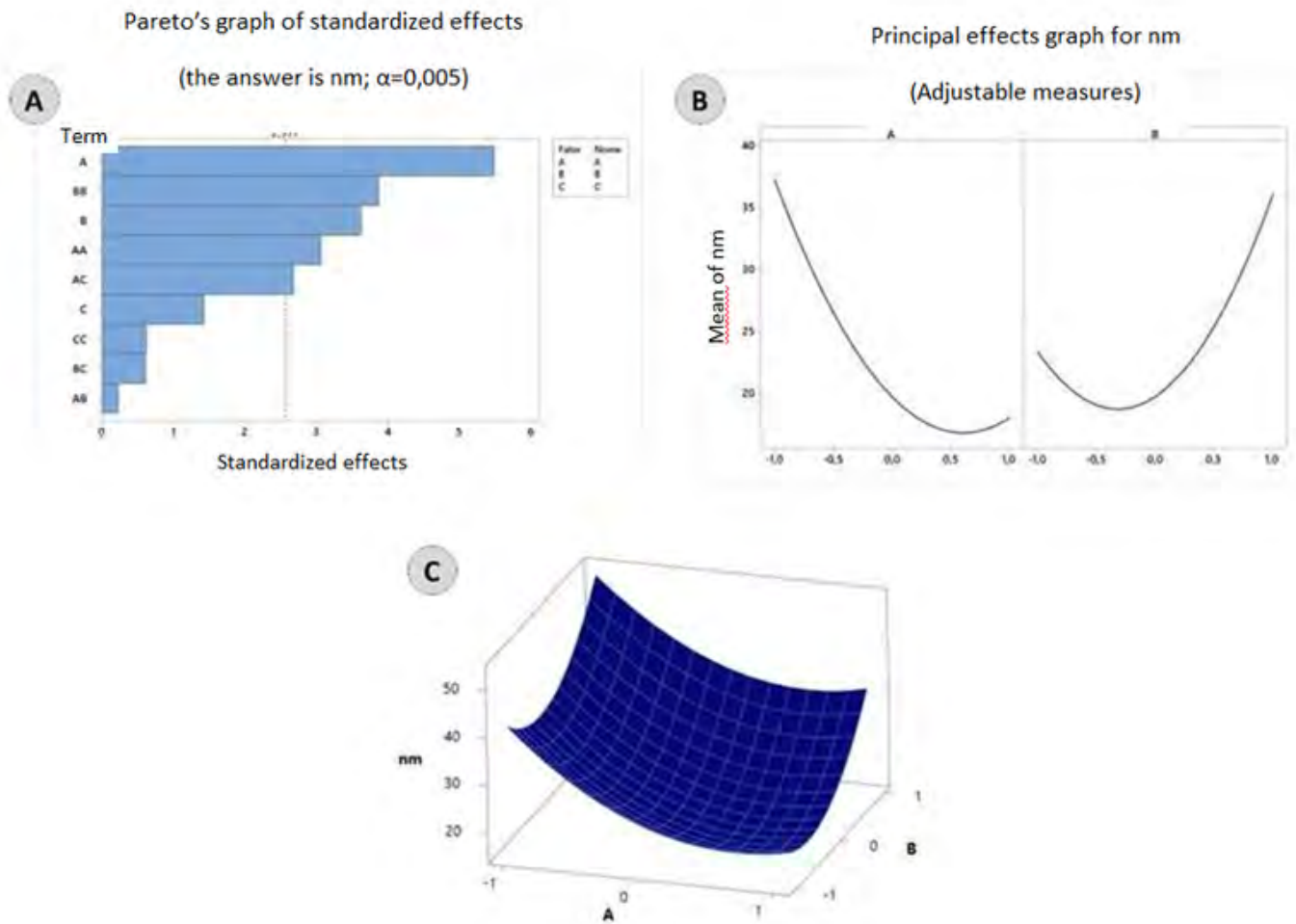


Figure 14 – Pareto (a), adjusted (b), and surface (c) means after the interaction of variables in the hydrodynamic diameter (HD) was analyzed.

As seen in Figure 3a, variables A (the ratio of surfactant to butter) and B (amount of drug) significantly impacted HD, demonstrating that increasing surfactant concentration promotes diameter reduction and rising drug concentration promotes growth in diameter (Figure 3b and Figure 3c). The reduction of HD with increasing concentrations of the surfactant is widely discussed in the literature, being related to the breakdown of surface tension and increased ability to cover lipid droplets (WAGHULE et al., 2019). It is suggested that the increase in hydrodynamic diameter (HD) proportional to the AIPc concentration results from the volume of this molecule, favoring the expansion of oil droplets on heating and the formation of larger NLC after cooling.

The PDI of the nanoparticles varies between 0.125 (experiment 5) and 0.315 (experiment 3). The effect of independent variables and factors on the PDI is demonstrated by **Equation 4:**

$$\text{PDI} = 0,1377 - 0,027A + 0,0131B - 0,0152C + 0,074A^2 + 0,0249B^2 + 0,0182C^2 + 0,0455AB - 0,0483 AC - 0,0048 BC$$

(Equation 4)

The correlation coefficient (R²) for Equation 4 was 0.97. The Pareto graph, the effects graph of suitable measures, and the response surface obtained by the interactions between variables is seen in Figure 15.

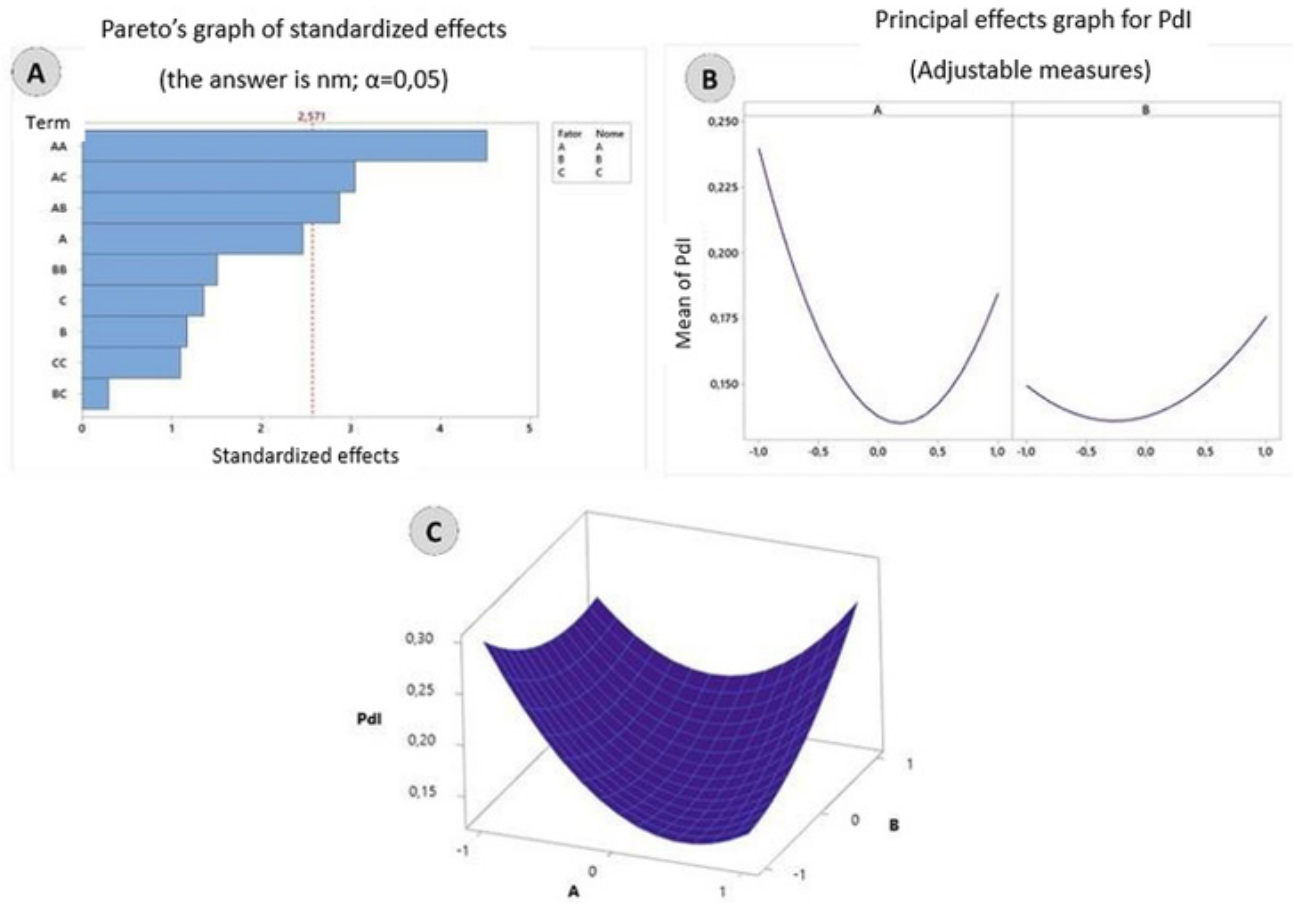


Figure 15 – Pareto (a), adjusted (b), and surface (c) means after the interaction of variables in the PDI was analyzed.

As seen in **Figure 4a**, the combinations of different ratios of surfactant to butter (variable A) significantly impacted the PDI. When analyzing the impact of this variable (**Figure 4b and Figure 4c**), it is observed that there is an optimal region of surfactant quantity which yields NLC with reduced PDI. Thus, it is suggested that low concentrations of surfactant are not capable of forming monodisperse structures, while the excess can form differentiated structures, such as micelles, both conditions producing polydisperse suspensions.

The zeta potential of the nanoparticles varied between -13.30 mV (experiment 1) and -4.37 (experiment 12). The effect of independent variables and factors on the PZ is demonstrated by **Equation 5**:

$$\text{PZ} = -10,423 + 1,759A + 0,834B + 1,922C + 1,497A^2 + 0,797B^2 - 1,126C^2 - 0,555AB + 1,348 AC + 0,573 BC$$

(Equation 5)

The value of the correlation coefficient (R2) for **Equation 5** was 0.93 indicating a good number. The Pareto graph, the effects graph of suitable measures and the response surface obtained by the interactions between variables is seen in **Figure 16**.

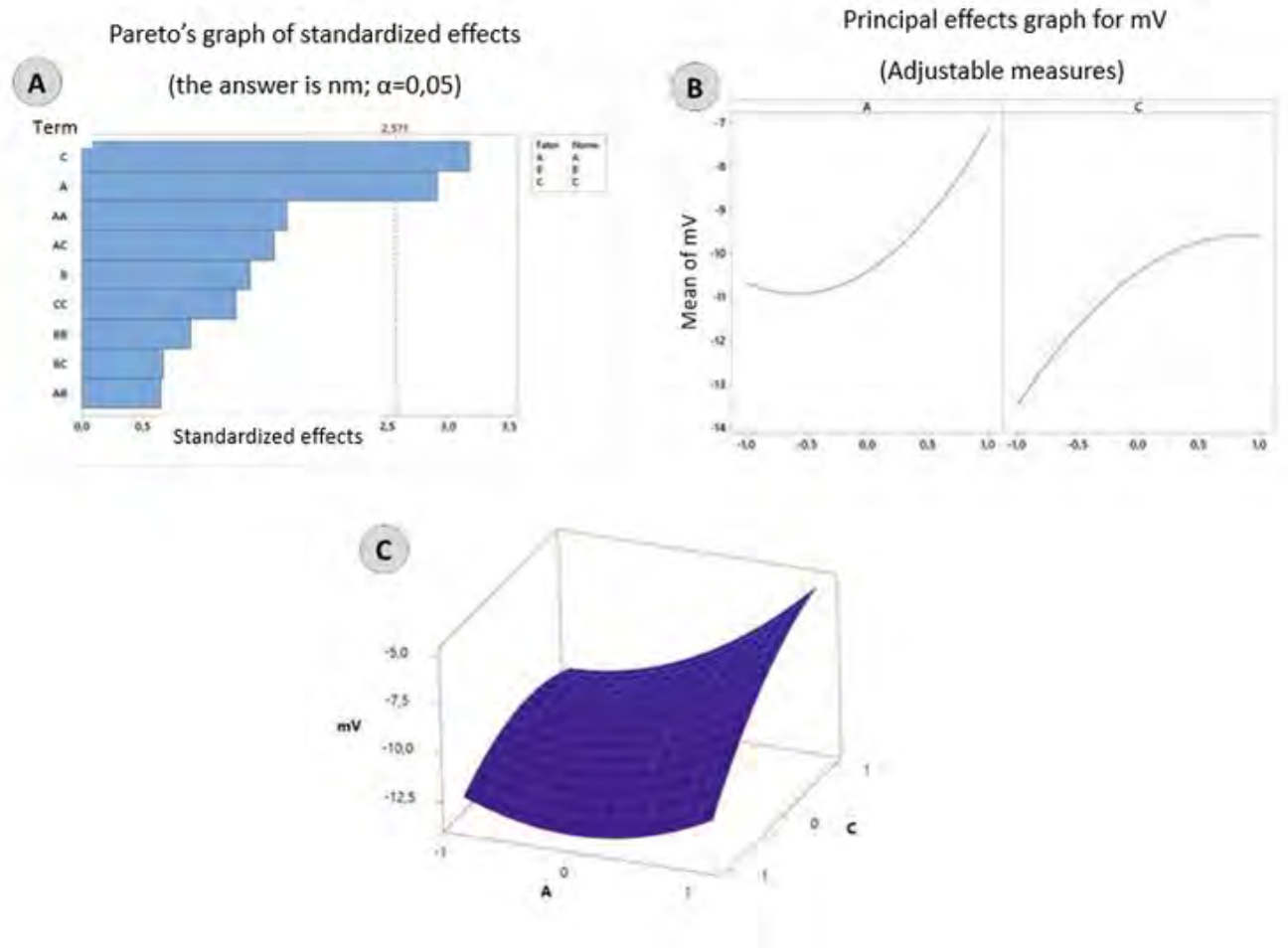


Figure 16– Pareto (a), adjusted (b), and surface (c) means after the interaction of variables in the zeta potential was analyzed.

As seen in **Figure 16a**, variables A (the proportions of surfactant and butter) and C (temperature) significantly impacted the zeta potencial. When analyzing the impact of this variable (**Figure 16b and Figure 16c**), it is observed that the increase in surfactant concentration and formation temperature promoted the development of NLC with zeta potencial with lower negative charges. The hypothesis is the increase in loads is due to the presence of possible free fatty acids from butter. For the growth proportional to the increase in temperature, it is suggested that higher temperatures promote better distribution of the fatty acids on the interface, favoring the increase in charges.

7.3 Characterization of NLC-AIPc

Table 5 shows the values of HD, PDI, zeta potencial, and encapsulation efficiency (EE%) before and after BB optimization. The NLC formulated with murumuru butter and Brij® O10 in a 2:1 ratio was chosen for conducting the next experiments.

Based on the above, the final NLC was selected, formulated with murumuru butter and Brij® O10 in a 2:1 ratio, with remarkable colloidal characteristics, which enable the moderate use of the surfactant. As a result, there is a reduction of toxicity. Table 5 shows the values of HD, PDI, PZ, and encapsulation efficiency (EE%) before and after BB optimization.

Sample	DH (nm)	PDI	PZ (mV)	EE%
NLC	55,53 ± 0,230	0,191 ± 0,001	-11,80 ± 2,600	61,50 ± 0,67
Optimized NLC	17,64 ± 0,213	0,173 ± 0,013	-5,61 ± 0,925	66,40 ± 1,12

Table 5 – HD, PDI, PZ and EE% values before and after BB optimization

Analysis of NLC-AIPc by transmission electron microscopy (TEM) can be seen in figure 17

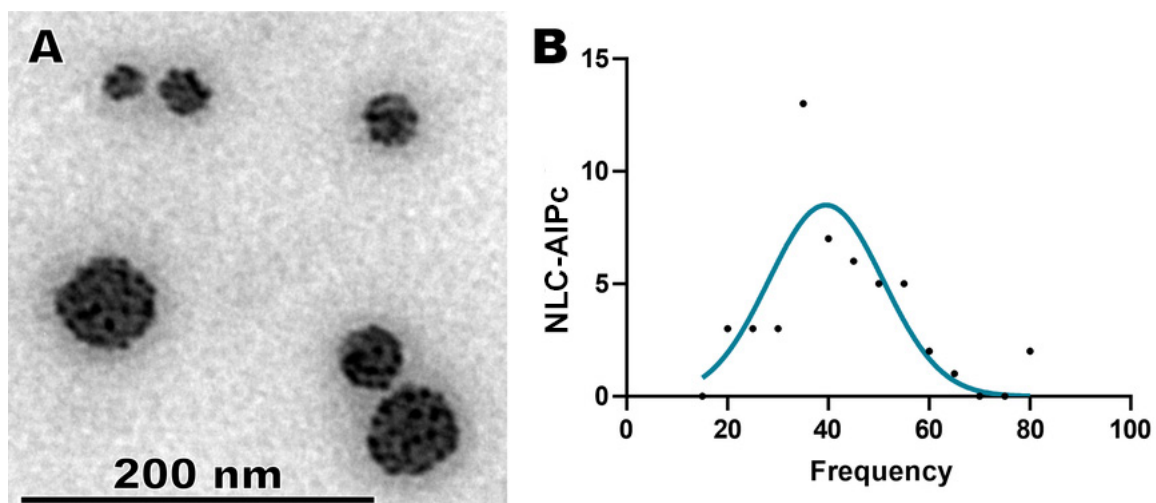


Figure 17 – Analysis of NLC-AIPc by transmission electron microscopy (TEM)

After pre-formulation, optimization and characterization studies of NLC-AIPc, we arrived at the final carrier that was used for in vitro efficacy tests. The method of preparation of the optimized formulation, as well as the probable representative scheme of the carrier can be seen in figures 18 and 19 respectively.

Preparation of NLC-AIPc

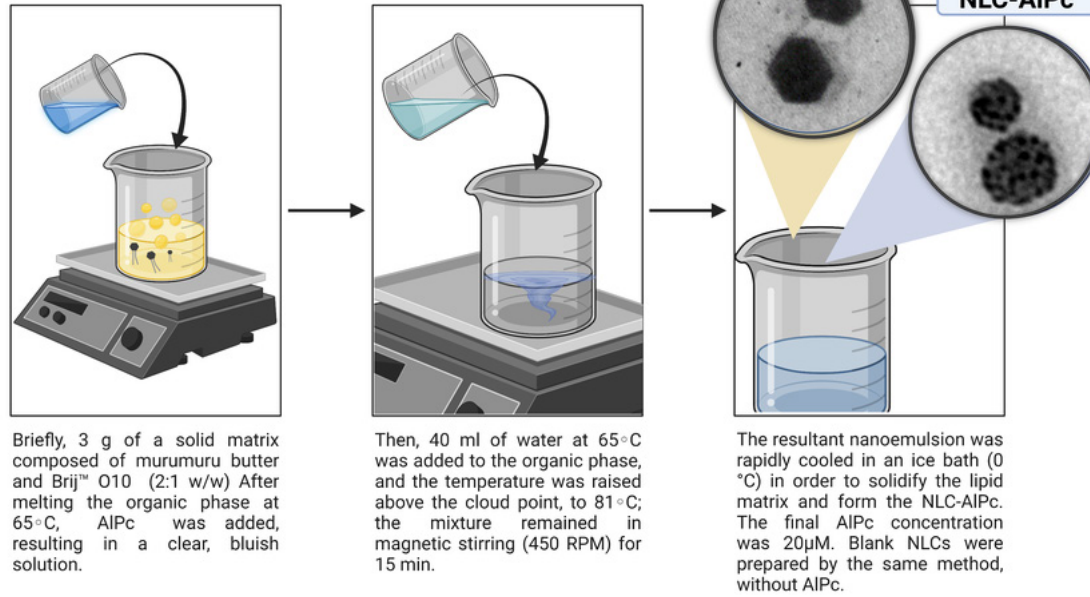


Figure18 – Preparation of NLC-AIPc

An interesting discovery was found during the nanocarriers morphological analysis (TEM). The morphology of the NLC-BLANK is cuboid and the carrier's, which contains AIPc (NLC-AIPc), is spherical. This fact can be explained by the changes in the crystallization of lipids present in the sample. Most lipids in solid dosage forms are triacylglycerides (TAGs)(SONODA *et al.*, 2006). It is known that during storage, the lipid matrix tends to crystallize causing drug expulsion, shape changing and giving rise to unwanted growth and particle agglomeration (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018a). Controlling polymorphic transitions allows metastable crystalline forms capable of trapping a greater amount of drug or ensures that lipid nanoparticles are developed into stable polymorphic forms, in which there will be no significant changes during storage of the dispersions. The physical properties of the O/W emulsion droplets are closely related to the control of the release of pharmacological materials solubilized in the emulsion droplets (SONODA *et al.*, 2006; THRANDUR *et al.*, 2009).

The hypothesis for the data found in the present work is that AIPc, which is extremely hydrophobic, has physically interacted with the mixture of lipid and surfactant, preventing the formation of crystals during the cooling of the formulation(GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018a). Figure 19 shows a schematic representation of the carrier without AIPc (19A) and the carrier containing AIPc (19b). In summary, the finding showed that the crystallization and polymorphic transformation of the oil phase can be modified from the interaction of AIPc with the surface of crystals. This result can be useful in the application in emulsions that aim to improve the solubility and release profile of phthalocyanines. Researchers like Thrandur *et al.* (2009) study how to control carefully the crystallization process, in order to create ideal crystalline matrices within lipid nanoparticles. Thus, controlling drug release, increasing stability and increasing the load of actives by the particles.

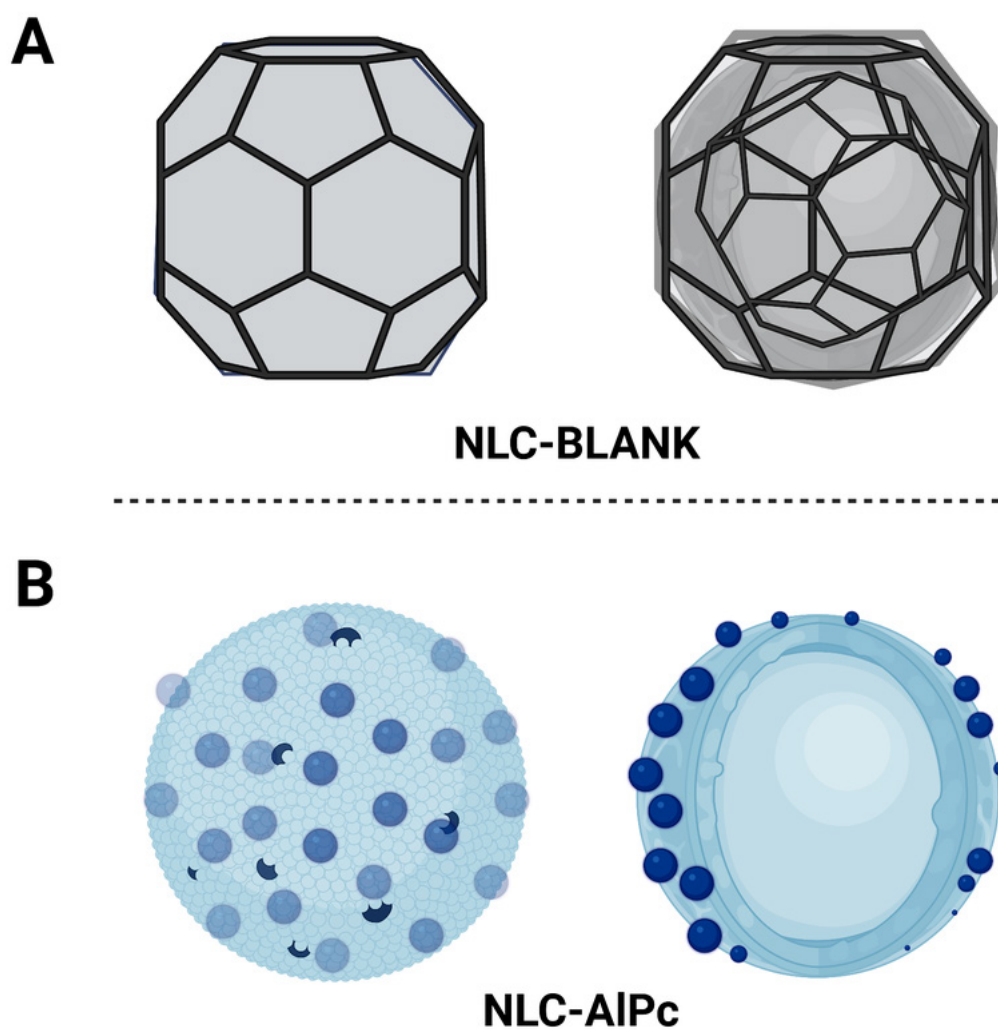


Figure 19 – Schematic illustration of the developed carriers. NLC-BLANK (A) and NLC-AIPc (B)

Trying to understand more about the phenomenon, more tests were carried out to evaluate the crystalline profile of the samples. Initially, the butters had their crystallinity profile evaluated by polarized light microscopy. It can be observed in Figure 20 that all, except for babassu butter, tend to form crystals. The crystallinity profile of Murumuru butter can be seen in figure 20A.

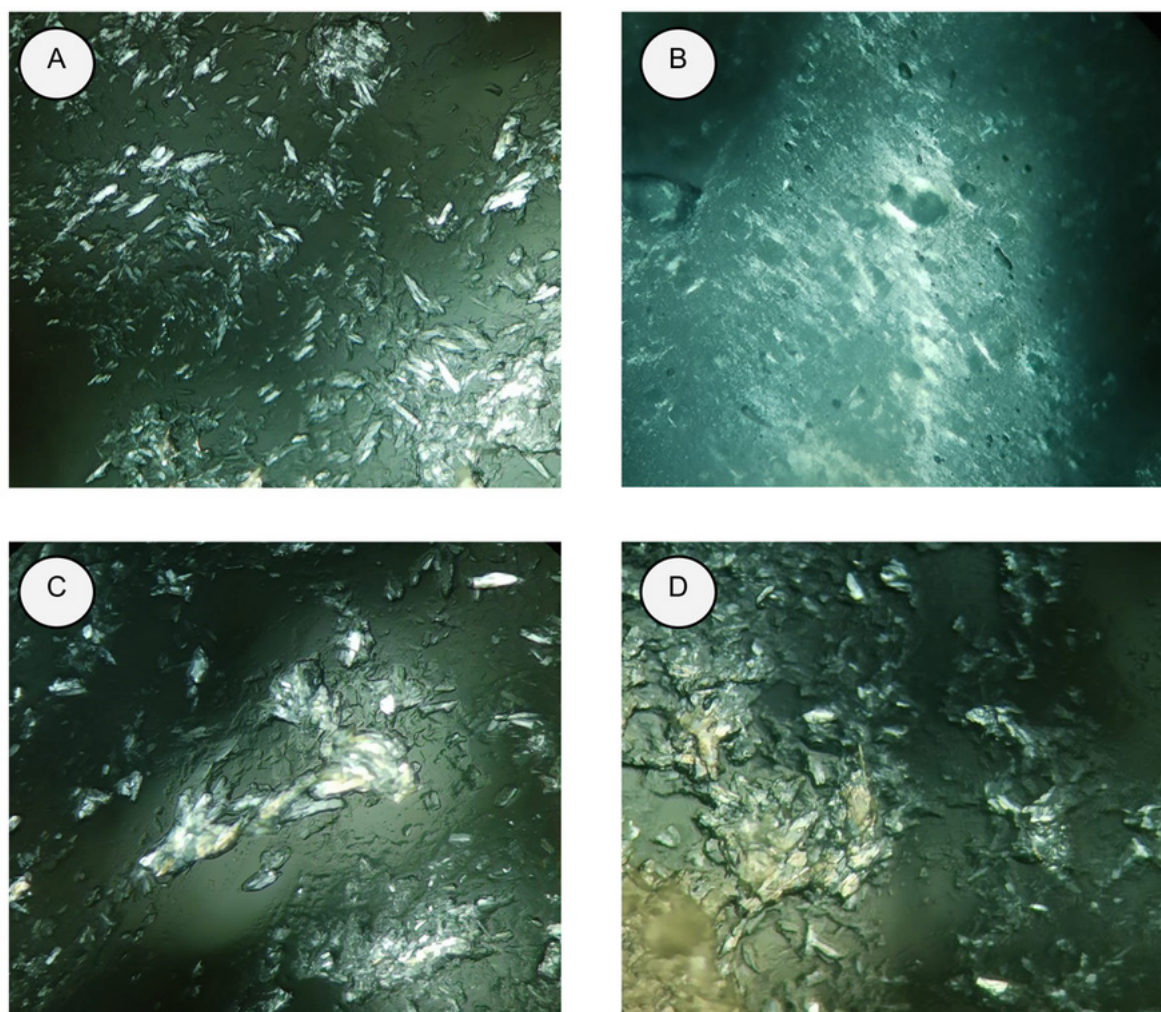


Figure 20 – Crystallinity profile evaluated by Polarized Light Microscopy. A) Murumuru butter B) Babassu butter C) Bacuri butter D) Ucuuba butter

One of the most used techniques to determine the physical state and crystal structure of NLC is Differential Scanning Calorimetry (DSC). The analysis of thermal events obtained by the DSC provides information about the structure and physical state of the particles, as well as the interaction between their components. In the same way, the different phase transitions, that occur in the sample, can be determined. During heating or cooling, lipids can undergo structural changes according to their chemical structure. Furthermore, the physical behavior of these lipids is related to the characteristics of the hydrocarbon chain, the presence of unsaturations, and cis or trans configurations (SONODA *et al.*, 2006; THRANDUR *et al.*, 2009).

The melting point and enthalpy change values obtained from the analysis of murumuru butter, AIPc, NLC-BLANK (drug-free nanosystem), and NLC-AIPc (nanosystems containing 20 μ M of AIPc) is seen in Table 6.

Sample	Melting Point	ΔH (Jg ⁻¹)
Mumumuru butter	38,37	63,88
AIPc	175,12	194,30
NLC _{BLANK}	96,30	1036,00
NLC-AIPc	93,25	873,20

Table 6 – Results obtained with DSC analysis of butter, AIPc and NLCs

The developed NLC has a higher melting point (>90°C) than that found by butter alone (38.37°C), suggesting the formation of systems with more consistent structure than that found in murumuru butter (ARAUJO *et al.*, 2020). The higher enthalpy variation presented by NLC is related to the large surface area demonstrated by these systems (MACKAY *et al.*, 2006), justifying the high variation between the nanosystems about butter and the drug alone. The presence of the nanoparticle lead to a reduction of the melting point of the nanosystem, suggesting that it was able to suppress the crystalline events of butter after cooling. Additionally, the absence of the endothermic event characteristic of AIPc was observed in the thermogram of the NLC sample, proposing that it is molecularly dispersed in the nanostructure (ARAUJO *et al.*, 2020; CHEN; REMONDETTO; SUBIRADE, 2006; CHEN *et al.*, 2006).

The decrease in crystalline events of NLC-AIPc, when compared to NLC-BLANK, confirms the hypothesis that AIPc hinders the crystallization of murumuru butter after cooling the formulation. The results categorize the developed carrier into the structure subtype of NLC (GORDILLO-GALEANO; MORA-HUERTAS, 2018a)), also known as amorphous type. NLC-AIPcs are carriers that have solid lipids that remain in the “polymorph α ” conformation after solidification. This is advantageous over type I NLCs, as no crystallization occurs and AIPc remains embedded in the amorphous matrix. The solid lipids β polymorph develops an organized and crystalline structured matrix (SHANGGUAN *et al.*, 2014; THRANDUR *et al.*, 2009) that can be seen on NLC-BLANK.

As seen, the optimization promoted a reduction of HD, made the nanosuspension more monodisperse, increased the potential zeta, and increased the EE% of AIPc. Furthermore, reduced HD is associated with greater adhesion of nanoparticles to the skin and may optimize therapy (SCHAFERKORTING; MEHNERT; KORTING, 2007; PATEL; KESHARWANI; KUMAR, 2019). As mentioned before, PDI is a good predictive parameter of colloidal stability, so the optimization promoted the formation of a more monodisperse nanosuspension, with possible colloidal stability, superior to that previously developed. The increase in potential zeta is related to the increase in the concentration of non-ionic surfactants used, which can also influence the increase in EE% observed since the surfactant can suppress the formation of crystalline events (ARAUJO *et al.*, 2020).

Figure 21 shows of Normal Raman of the samples murumuru butter, NLC_{BLANK} , blank physical mixture, physical mixture with phthalocyanine and NLC-AIPc. In Figure 21a the main characteristic peaks of the spectrum are assigned to the lipids, being in accordance with Ganassin *et al.* (2022c). Some changes were observed when AIPc was loaded into NLC_{BLANK} , however, the main one occurred on the peak at 1726 cm^{-1} assigned to the *trans* stretching C=O which is present in the chemical structure of the lipids in murumuru butter (figure 21a). In NLC_{BLANK} , Figure 21b, a broad band is observed in this region instead of a peak, while after the incorporation of AIPc into the nanostructured system (NLC-AIPc) the peak at 1726 cm^{-1} is observed again (Figure 21e). These changes in the spectra is a strong indication that the presence of AIPc which is highly hydrophobic, is stabilizing the system by different interactions than those present in NLC_{BLANK} , which are probably by hydrogen interactions, since the peaks observed in the spectrum of this sample are broader when compared to that of NLC-AIPc.

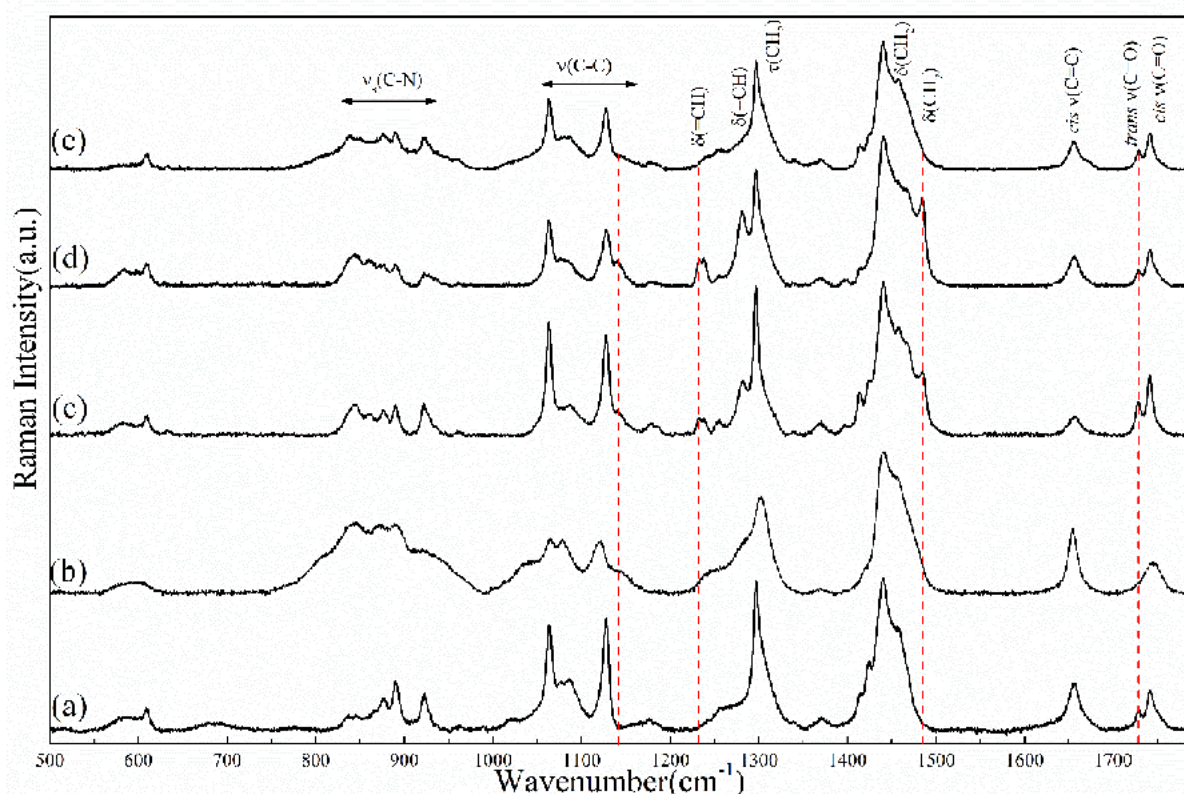


Figure 21 – Normal Raman spectra of samples of the murumuru butter (a), NLC_{BLANK} (b), blank physical mixture (c), physical mixture with phthalocyanine (d) and NLC-AIPc (e).

Other changes observed in the spectra were in the region of 1140 cm^{-1} assigned to $\nu(\text{C-C})$, which in the blank physical mixture and phthalocyanine with physical mixture fig. 1(c

and d) is observed the appearance of a peak, and it is more intense in phthalocyanine with physical mixture, and it not being observed this peak in NLC_{BLANK} , murumuru buter and NLC-AIPc. The peaks at 1230 cm^{-1} , 1280 cm^{-1} and 1480 cm^{-1} assigned to the vibrational modes $\delta(=CH)$, $\delta(=CH)$ and $\delta(CH_2)$, respectively, they are also present only in the samples blank physical mixture and phthalocyanine with physical mixture fig. 21 (c and d). In other words, these peaks are observed only in physical mixtures, where no formation of the nanostructured system itself occurs.

Figure 22 shows spectrum Normal Raman of murumuru butter, spectrum SERS of the samples AIPc, NLC_{BLANK} and NLC-AIPc.

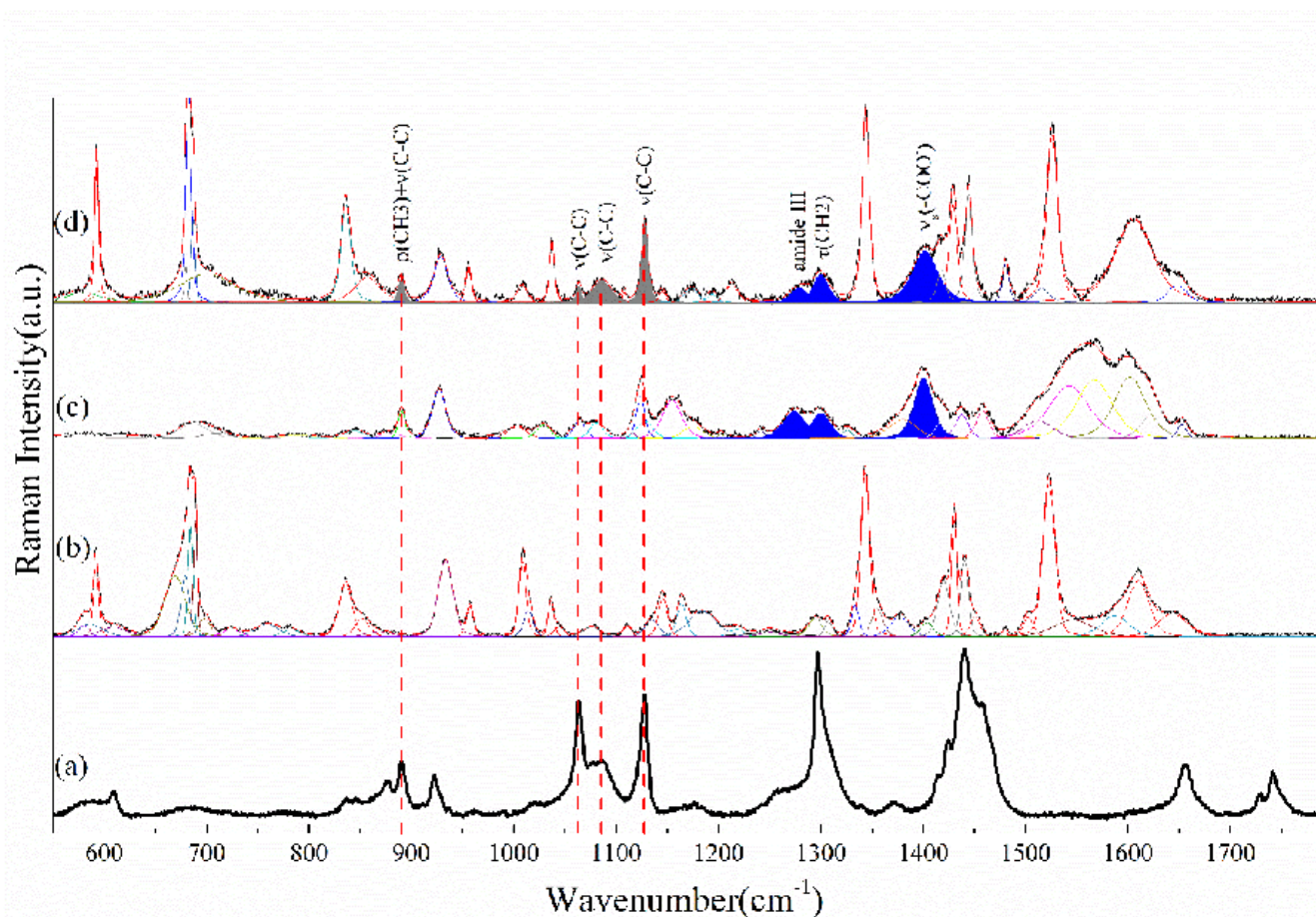


Figure 22 – Spectrum Raman normal of murumuru butter (a), spectrum SERS of the samples AIPc (b), NLC_{BLANK} (c) and NLC-AIPc (d).

To confirm the incorporation of AIPc into the nanostructured system (NLC_{Blank}), SERS spectra of AIPc, NLC_{BLANK} and NLC-AIPc Fig. 2 (b-d) were obtained to verify changes in the spectral regions. For comparison, the Normal Raman spectrum murumuru butter (Fig. 22a) is also presented to indicate that in NLC-AIPc has contributions from murumuru butter and that it is present in NLC-AIPc.

Figure 22b shows a typical SERS spectrum of AIPc, although the AIPc molecule exhibits highly coupled vibrational modes, it is possible to affirm that the raman spectrum is

predominated by vibrations of the benzene ring (near 868, 1111, 1115, 1307, 1343, 1420, 1587 and 1610 cm^{-1}), of the macrocycle (near 592, 836, 1523 and 1547 cm^{-1}) and of the pyrrole (approximately 1036 and 1218 cm^{-1}), being in agreement with the obtained by Muehlmann *et al.* (2015b). The SERS of NLC-AIPc, Figure 2d, the peaks highlighted in light gray at 890, 1063, 1085, 1128 cm^{-1} , assigned respectively to $\rho(\text{CH}_3)+\nu(\text{C-C})$ and $\nu(\text{C-C})$ for the other peaks, is an indication of the presence of murumuru butter (see spectrum of figure 22a). Figure 22c shows the SERS spectrum of NLC_{BLANK}, whose peaks at 1275, 1299 and 1399 cm^{-1} assigned to amide III, $\tau(\text{CH}_2)$ and $\nu_s(-\text{COO}^-)$, respectively, highlighted in blue in figure 22d are characteristic peaks of NLC_{BLANK}. The other peaks present in figure 22d are almost all assigned to the vibration modes of AIPc, as can be observed in figure 22b, which allows us to infer that incorporation of AIPc into the nanostructured system has occurred.

The SERS spectrum of NLC-AIPc shows characteristics of the murumuru butter, NLC_{BLANK} and AIPc, showing that AIPc is predominant in the SERS spectrum of NLC-AIPc, suggesting that AIPc is incorporated into NLC_{BLANK}.

7.4 Photo-physical properties

Absorbance and fluorescence emission spectra were obtained for NLC and NLC-AIPc (Figures 23 and 24). It was found that NLC-AIPc containing final AIPc concentrations of 20 μM and 40 μM (NLC-AIPc-20 and NLC-AIPc-40, respectively) presented absorbance peaks close to 680 nm (676 nm and 674 nm, respectively). This is an important characteristic to be considered when evaluating its use in anticancer PDT since the ideal therapeutic window for PDT is in the spectral region between 600 - 800 nm, where radiation penetration into living tissue is greater and absorption by endogenous chromophores (water, proteins, pigments such as melanin and bilirubin) is lower (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; CONTE *et al.*, 2016).

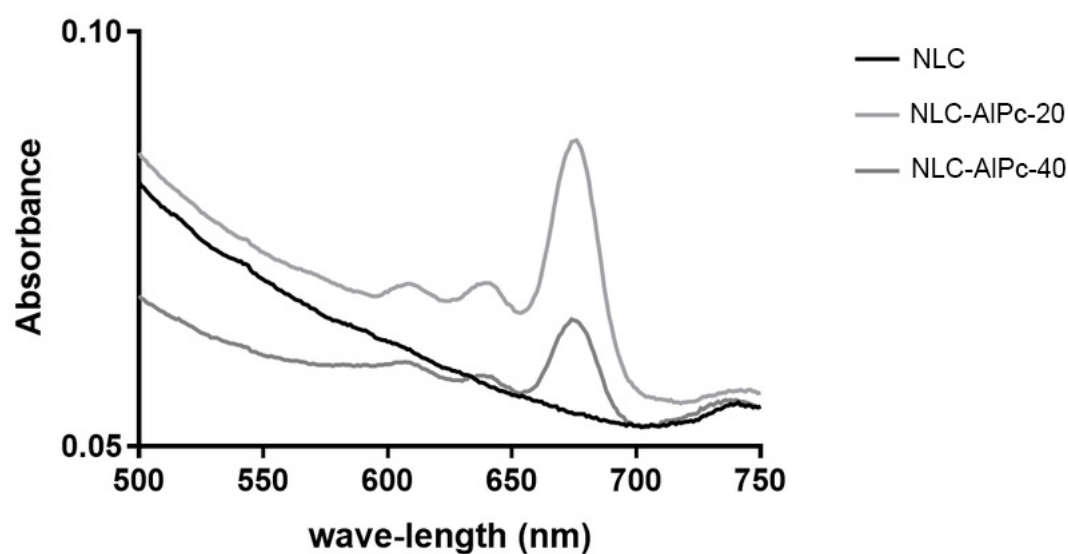


Figure 23 – Absorbance analysis of the NLC, the NLC-AIPc, (20uM), NLC-AIPc-40(40uM). NLC-AIPc-20 and NLC-AIPc-40 showed absorbance peaks close to 680 nm.

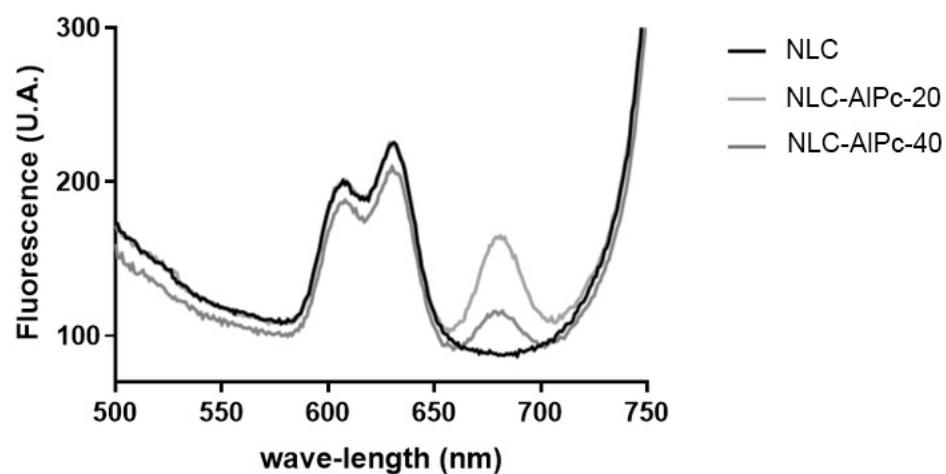


Figure 24 – Fluorescence analysis (400 nm excitation) of the NLC, the NLC-AIPc20, (20uM), NLC-AIPc-40(40uM). Peaks related to NLC-AIPc-20 and NLC-AIPc-40, are close to 680 nm (683 and 682 nm, respectively).

Regarding fluorescence, it was found that the increase in AIPc concentration was

accompanied by a reduction in fluorescence emission, an event related to the effect of fluorescence quenching by proximity between the PS molecules (MUEHLMANN *et al.*, 2015b).

Thus, the variation in the concentration of AIPc in the NLC-AIPc did not result in significant differences in the average particle size, in the average polydispersity index or the zeta potential of the formulations. However, it was found that NLC-AIPc-20 and NLC-AIPc-40 showed absorbance and fluorescence peaks close to 680 nm and that the increase in AIPc concentration was accompanied by a reduction in fluorescence emission (quenching effect).

In vitro experiments suggest that PS loading by nanocarriers can optimize its photophysical properties and its interaction with cells (MUEHLMANN *et al.*, 2015b). The results obtained corroborate this hypothesis as longer wavelengths were observed in the NLC, which allows the absorption of light in deeper layers, favoring the effectiveness of PDT.

7.5 Physical-Chemical Properties

The efficiency of PDT is closely linked to the physicochemical properties of PS. PS can absorb light and transmit the absorbed light energy to molecular oxygen, changing its energy state and forming ROS. Thus, to verify the efficiency of ROS production by the NLC-AIPc obtained, the method DBF described by Spiller was used. DPBF is a reagent degraded by ROS, which can be measured by the drop in the intensity of its peak absorbance at a wavelength of 411 nm.

Corroborating the results found in the fluorescence emission analysis, both NLC-AIPc-20 and NLC-AIPc-40 showed high percentages of ROS production. NLC-AIPc-20 stands out for presenting maximum ROS production achieved at an energy density of 5.50 J/cm² while the other formulations still showed growth at 10.0 J cm². As expected, NLC did not produce ROS under irradiation by LED (Figure 25).

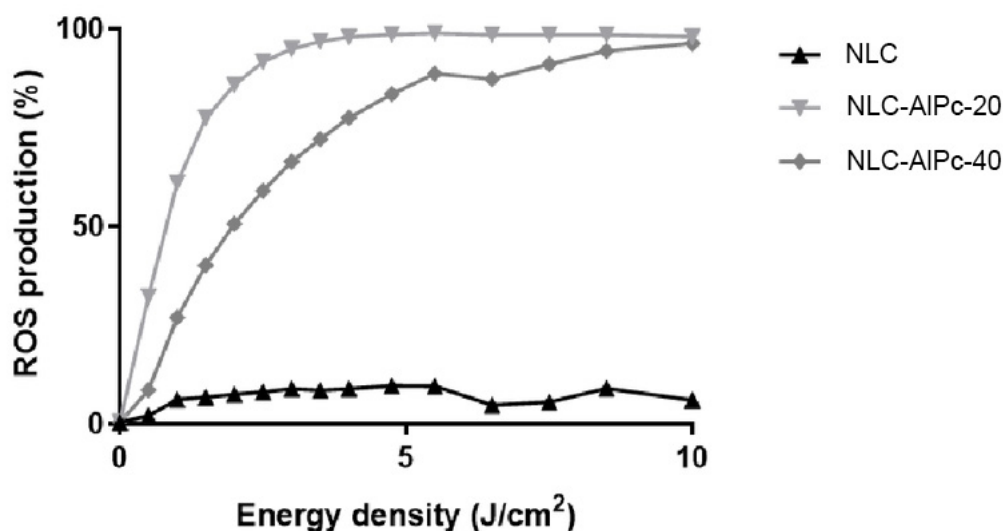


Figure 25 – ROS production by the DBF degradation method for the different concentrations of AIPc associated with NLC (results already published)

E-SIMPFAAR, 4., 2020, Youtube. Sociobiodiversidade e Nanotecnologia: Desenvolvimento de Nanopartícula Lipídica Sólida à Base de Manteiga de Murumuru (*Astrocaryum murumuru*) para Carreamento de Cloreto de Alumínio-ftalocianina em Terapia Fotodinâmica Anticâncer [...]. [S.l.: s.n.], 2020.

Based on the results of the analysis of the photo-physical and physicochemical properties, the NLC-AIPc-20 and NLC-AIPc-40 were chosen to continue the experiments of stability.

7.6 Stability under storage

During the 90 days of observation, the three nanosystems remained stable at RT (Room Temperature) and 4 °C, with no significant change ($p < 0.05$) of DH, PDI and PZ (Figures 26, 27, 28). NLC synthesized from murumuru butter using the PIT method were also evaluated by Gomes *et al.* (2019) and demonstrated high stability for 90 days, revealing good prospects for the future of the NLC produced in this study.

Samples kept in an oven (37 °C) began to show changes in HD and PDI between 45 and 90 days, indicating instability. Such instability is due to the melting point of murumuru butter is in the range between 30 and 35 °C and the high temperature of the oven probably interfered on the arrangement of the system and favored the formation of aggregates.

	Day 1	Day 90	Day 176
Room Temperature			
DH (nm)	35,64 ± 0,913	57,53 ± 1,195	60,41 ± 3,41
ZP (mV)	-5,61 ± 0,925	-6,63 ± 0,249	-5,09 ± 0,732
Pdl	0,123 ± 0,013	0,118 ± 0,009	0,192 ± 0,027
4°C			
DH (nm)	35,64 ± 0,913	54,36 ± 1,628	49,12 ± 2,198
ZP (mV)	-5,61 ± 0,925	-7,64 ± 0,826	-5,89 ± 1,012
Pdl	0,123 ± 0,013	0,149 ± 0,018	0,192 ± 0,027
37°C			
DH (nm)	35,64 ± 0,913	257,3 ± 24,60	Phase separation
ZP (mV)	-5,61 ± 0,925	-6,63 ± 0,249	
Pdl	0,123 ± 0,013	0,346 ± 0,084	

Figure 26, 27 e 28– Stability of NLC-AIPc by the parameters of DH, IPD and PZ, for 1, 90 and 176 days, at room temperature, 4°C and 37°C

7.7 Carrier internalization, mechanisms of endocytosis and subcellular location

An important parameter to be studied in order to develop a therapeutic protocol for photodynamic therapy (PDT) is the internalization of the photosensitizer by target cells. To choose the best exposure time to the nanocarrier, the internalization of NLC-AIPc was analyzed at 5, 15 and 30 minutes after interaction with the B16-F10 cell line.

The results reveal that cells exposed during 15 and 30 minutes showed higher AIPc-specific fluorescence intensities than at 5 minutes (Fig. 29A). The time of 30 minutes (orange peak) was the one that showed the highest fluorescence intensity after exposure. It is possible to observe in the histograms of fluorescence intensity that the peak area related to time of 15 minutes covers most areas of the peaks of 5 minutes and 15 minutes (red peak). Therefore, the time chosen for the next experiments was 15 minutes. A reduced AIPc exposure time, in addition to decreasing possible toxicity in non-irradiated groups, also facilitates multi-step protocols and experiments. The time of 15 minutes of exposure before irradiation was also used by Rodrigues (2014), Morais *et al.* (2021), Rodrigues *et al.* (2022c). By transpose to future protocols in vivo it is also expected a shorter exposure time may also decrease toxicity in healthy cells and tissues. Analysis of the internalization profile was also performed by transmission electron microscopy (Fig. 29D) and confocal laser microscopy (Fig. 30).

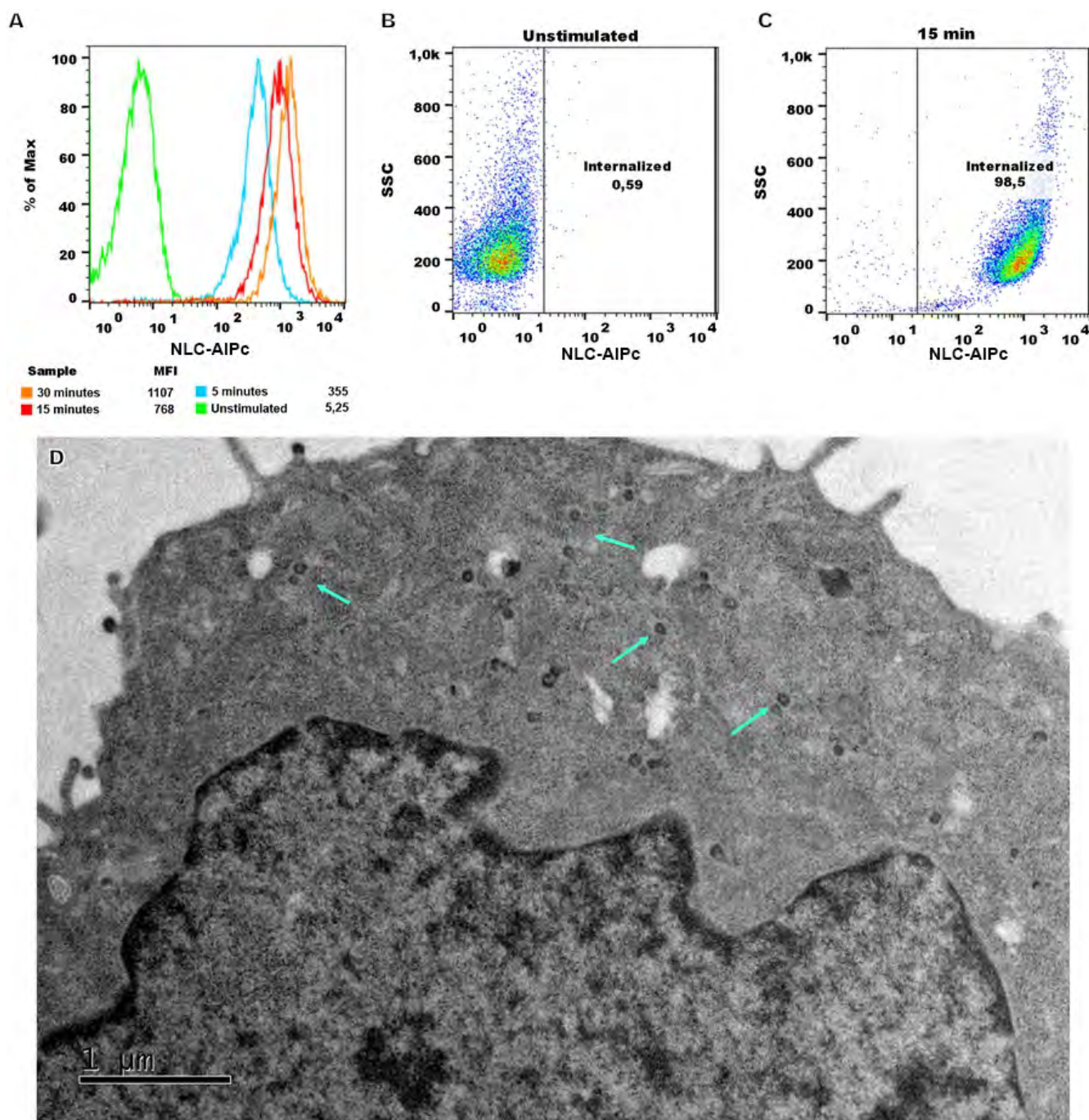


Figure 29 – Carrier internalization. A) Mean fluorescence intensity (MFI) histogram indicates the internalization of the carrier in times 5, 15 and 30 minutes. B) Morphological analysis by flow cytometry of the unstimulated and C) 15 minutes experimental groups. D) Visualization, by TEM, of NLC-AIPc (arrows) in B16F10 cells, after 15 minutes exposure.

During the analysis of internalization by confocal laser fluorescence microscopy, it was noted that the PS (30) in just 15 minutes of exposure to the B16-F10 strain, is already colocalized with the nucleus labeled with DAPI (30). In image 30 it is possible to observe a fluorescence leak emitting in green. The same fluorescence (green) is not observed in the nucleus. The hypothesis is that the green fluorescence is relative to a second population of

NLC-AIPc, however with self-aggregate of AIPc. Self-aggregate of AIPc are substantially non-fluorescent. This fact explains the reduction in fluorescence, and consequently the emission in green. According to (CALORI; TEDESCO, 2016), fluorescence quenching is a useful technique for estimating the location of fluorophores in micro-heterogeneous systems. In their study, it was shown that liposomes containing AIPc, when in OSCC lineage cells, presented two populations with different half-lifetime, and which are explained by fluorescence quenching. As we see in the present work, the AIPc with the longest fluorescence lifetime was preferentially located in the cell membrane, while the short-lived AIPc is visualized in the intracellular region. After AIPc uptake, the molecules of AIPc suffer dilution in the intracellular medium. In this new environment the physicochemical and photophysical characteristics of AIPc are not influenced by carrier anymore, since PS is released inside cellular organelles (CALORI; TEDESCO, 2016; JAYME; CALORI; TEDESCO, 2016).

The images clearly show that the green fluorescence present in the cell membrane decreases with time, while the red fluorescence increases proportionally, which indicates that inside cells the AIPc again tends to assume a monomeric form, over time. Unlike the self-aggregation of AIPc in aqueous medium, the aggregation of NLC-AIPc is reversible (CALORI; TEDESCO, 2016).

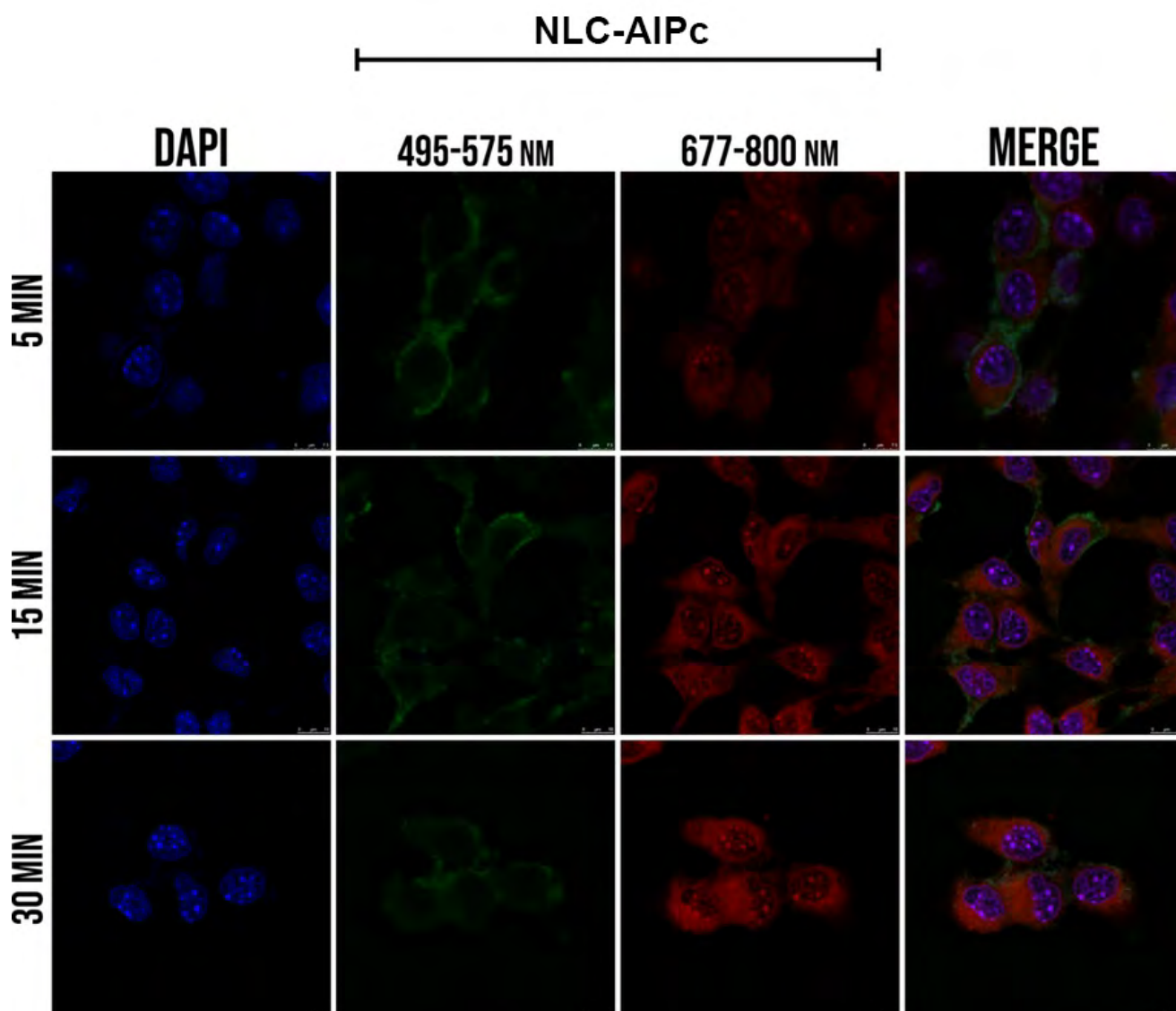


Figure 30 – Internalization analysis (confocal laser microscopy). *Cell nucleus in blue (DAPI), NLC-AIPc with fluorescence quenching in green, preferentially located in the cell membrane, and AIPc with a monomeric form in red.* After AIPc uptake, the molecules of AIPc suffer dilution in the intracellular medium, inside cells the AIPc again tends to assume a monomeric form, having its fluorescence restored.

Understanding endocytosis and intracellular mechanisms of nanoparticles are indispensable to design therapeutic applications to being useful in the cytotoxic evaluation of these materials. The study of cell traffic is crucial in the development of nanocarriers, because when the intracellular target is defined, it is possible to improve the therapeutic application. Consequently, it provides more effective medical treatments (IVERSEN; SKOTLAND; SANDVIG , 2011).

Endocytosis is a physiological process that has been shaped by evolutionary process to play a a number of biological roles in each cell type, which is directly linked to the function that cell performs in its tissue of origin. Therefore, it is highly expected that this process

is cell type dependent. Most of the time, nanoparticles are internalized by more than one pathway which can result in different biological responses and one pathway can lead to more efficient degradation (MUEHLMANN *et al.*, 2015c; GANASSIN *et al.*, 2022c).

To search endocytosis pathways, used by B16-F10 cells to internalize NLC-AIPc, it was performed using a recent methodology (GANASSIN *et al.*, 2022d). Cells B16-F10 exposed to NLC-AIPc without inhibitors were used as a positive control and cells that were not exposed to inhibitors or NLC-AIPc were used as a negative control. The results can be observed in Fig 31a-f. The only endocytosis inhibitors that caused a decrease in the internalization of NLC-AIPc were amiloride and cytochalasin D. Both inhibitors are inhibitors of macropinocytosis (LIM; GLEESON, 2011).

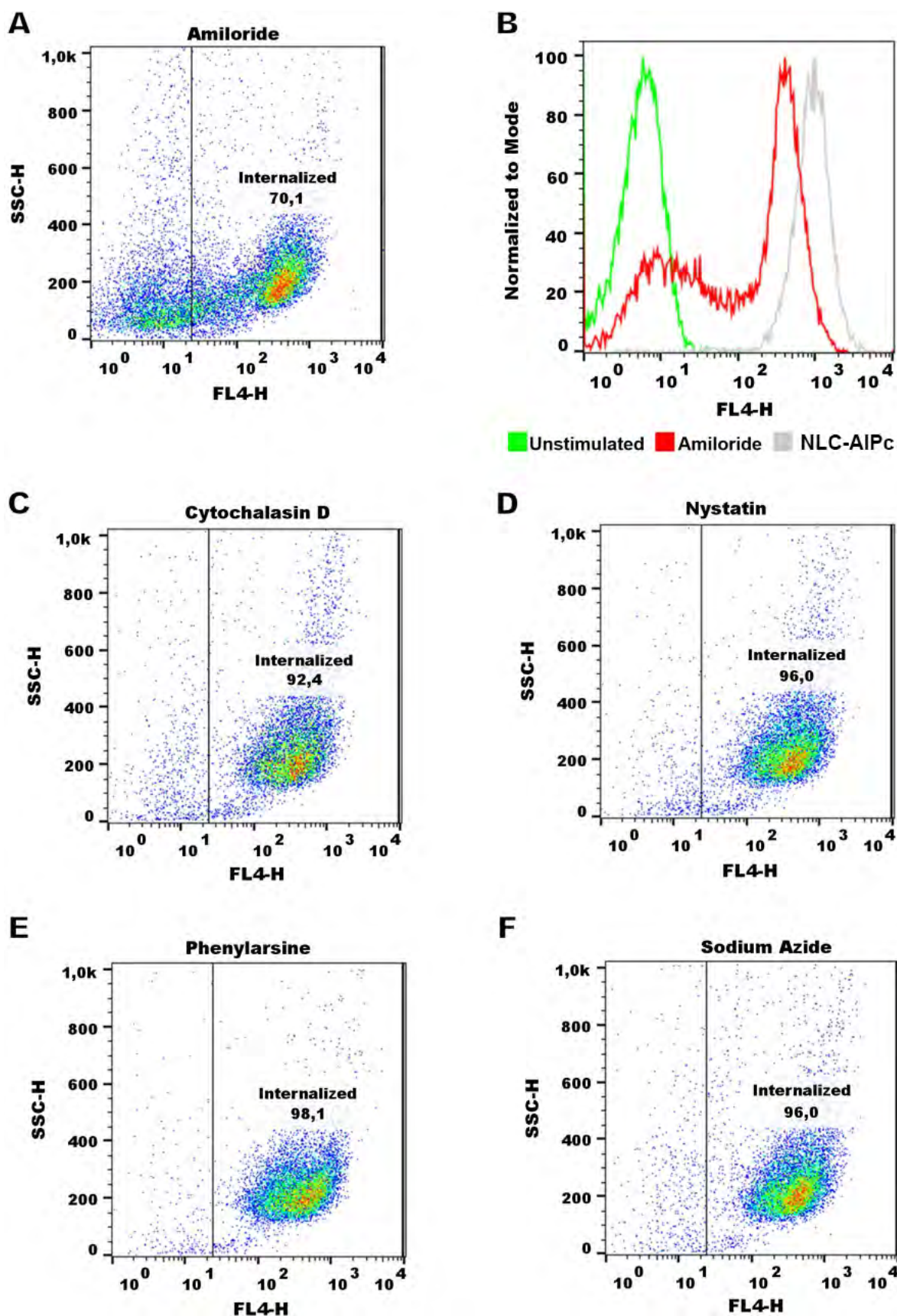


Figure 31 – Endocytosis pathways. A and B represent the test that used Amiloride as an NLC-AIPc endocytosis inhibitor. The reduction of fluorescence intensity indicates that by inhibiting the pathway, the internalization of the carrier is also reduced. Thus, confirming the macropinocytosis pathway as the main form of internalization by the B16-F10 strain. C, D, E and F represent the inhibition of other endocytosis pathways, with no significant difference.

It was observed that only the inhibitor amiloride showed a decrease in fluorescence intensity, indicated by a shift to the left, which is indicated in figure 31b. This shows that the nanocarrier is primarily internalized by macropinocytosis. This pathway is characterized by the movement of the plasma membrane induced by a global activation of the actin cytoskeleton. This pathway involves the transposition of a large amount of external colloid through the formation of ripples along the plasma membrane: cytoplasmic projections merge into the membrane as waves, resulting in large endocytic vacuoles, heterogeneous in size and morphology, called macropinosomes (JONES, 2007). The colocalization of NLC-AIPc with the cytoskeleton (Fig. 32A-E) and the visualization of spherical actin structures (not seen in the other groups) after exposure of B16-F10 cells to the carrier (Fig33), suggesting possible macropinosomes, confirm the endocytosis of NLC-AIPc mediated by macropinocytosis.

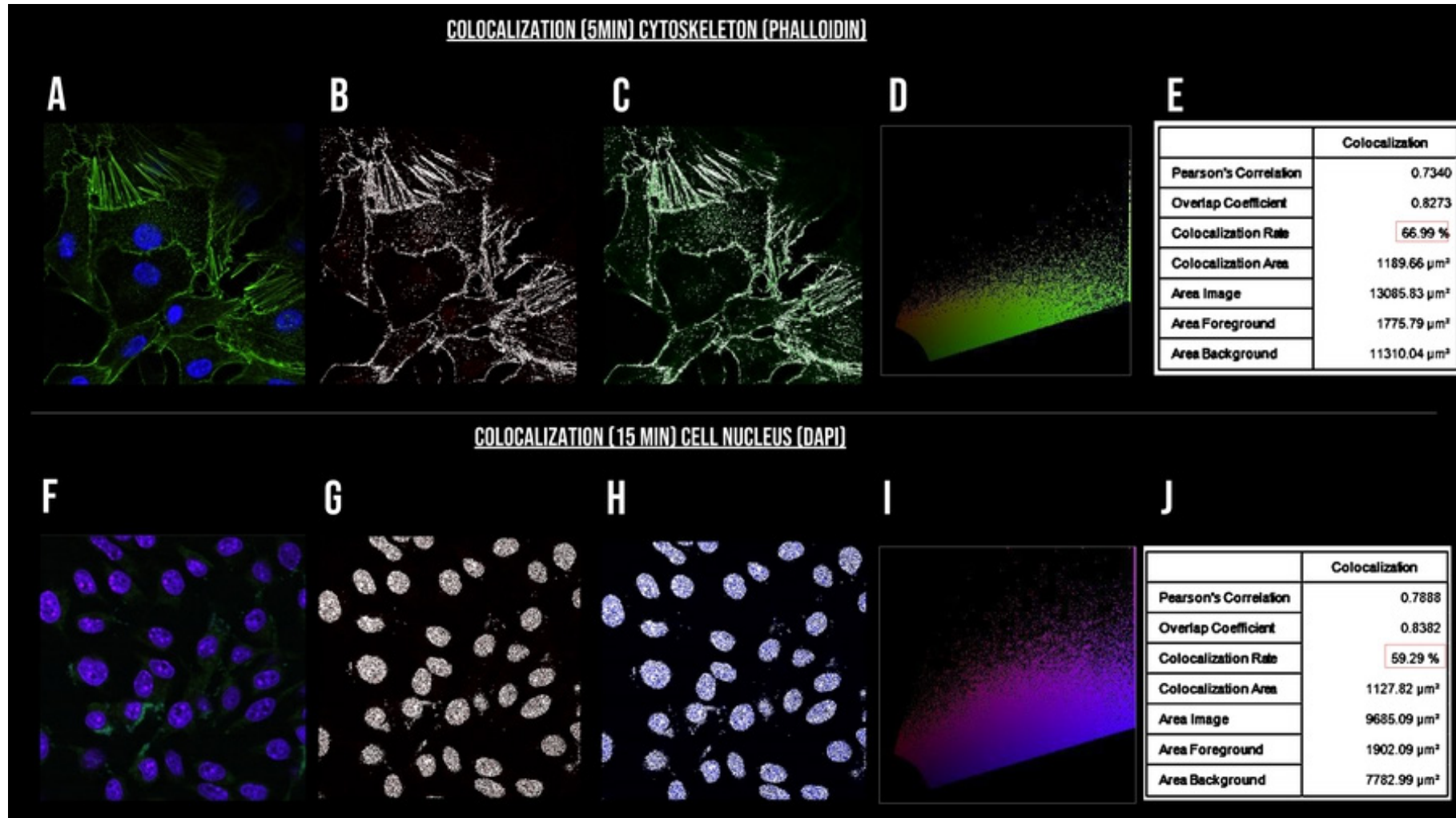


Figure 32 – Colocalization Analyses. White dots represent the pixels where fluorescences are co-localized. Images A, B, C, D and E are related to cytoskeleton colocalization analysis. Merged (A) NLC-AIPc in red (B), cytoskeleton in green (C), colocalization filter for cytoskeleton and NLC-AIPc (D), analysis data (E). A high rate of colocalization is noted, reinforcing that NLC-AIPc uses the cytoskeleton for cellular internalization. Images F, G, H, I and J are related to nucleus colocalization analysis. Merged (F) NLC-AIPc in red (F), nucleus in green (G), colocalization filter for nucleus and NLC-AIPc (I), analysis data (J). A high rate of colocalization is noted for both analyzes.

Macropinocytosis involves actin-mediated membrane wrinkling. Most lamellipodia formed will retract back into the cell. However, a subset of lamellipodia can fold in on itself and fuse with the basement membrane, creating large, irregular vesicles called macropinosomes. Macropinosomes are distinct from other forms of endocytic vesicles. Macropinocytic vesicles have no apparent coating structures and, although heterogeneous in size, are generally considered to be $>0.2 \mu\text{m}$ in diameter, a considerably larger size than clathrin-coated vesicles. Due to the large size of macropinosomes, which can be up to $5 \mu\text{m}$ in diameter, macropinocytosis provides (JONES, 2007; LIM; GLEESON, 2011).

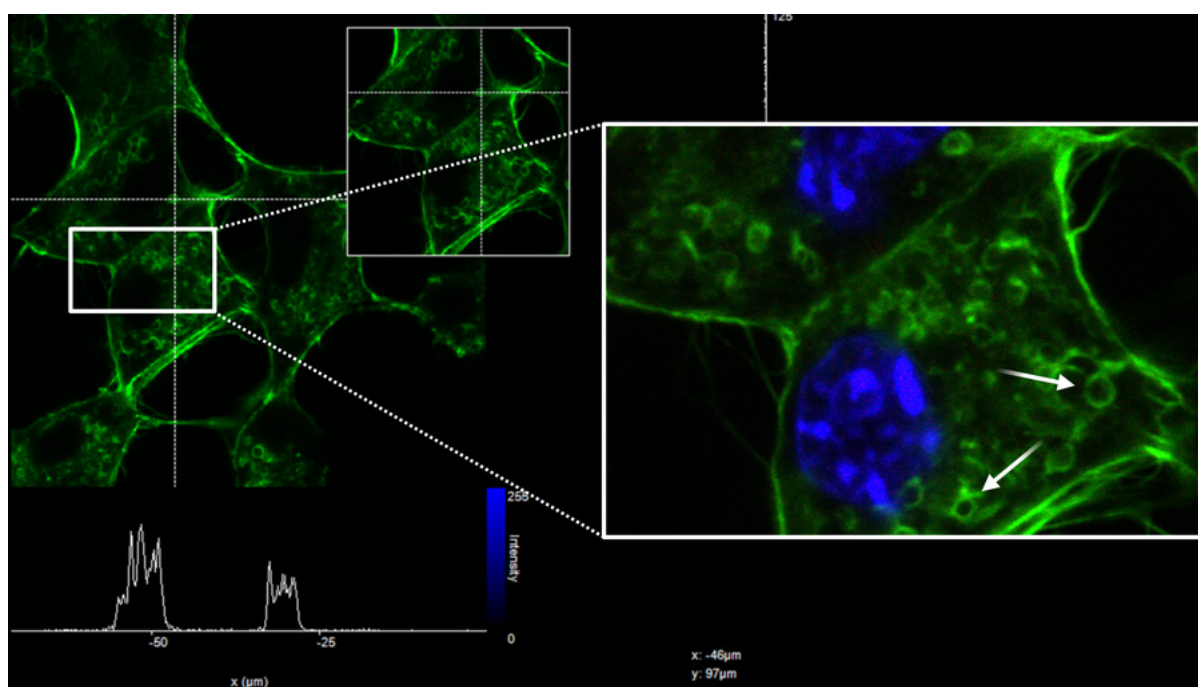


Figure 33 – Formation of macropinosomes after exposure to the carrier

Although the definition of macropinocytosis may give the impression of being a random process, it is actually a very complex and well-coordinated cellular one (FALCONE *et al.*, 2006). For confirmation of the macropinocytosis pathway, co-localization analysis of NLC-AIPc with the cytoskeleton was performed and can be seen in the figure below.

7.8 *In Vitro* tests for the assessment of safety, effectiveness and death analyses

NLC, NLC-AIPc-20 (20uM) and NLC-AIPc-40 (40uM) were tested to prove their activity in the dark and when exposed to LED. *In vitro* tests on murine melanoma cells (B16F10), LED light by itself did not directly affect the viability of the cells tested, as shown in Figure 34. This result is in agreement with those described in the literature, as this source of light emits light at low intensity, with little potential to damage biomolecules. Regarding the effects promoted by NLC without photosensitizer, cytotoxic effects were also not observed

when the nanocarrier was exposed to cells in the dark. This result in the dark is a good indicator of biocompatibility, demonstrating the low cytotoxic potential of this formulation.

On the other hand, when cells were exposed to the nanostructured system containing AIPc, we observed a significant decrease in cell viability of B16F10 cells containing NLC-AIPc-20, with an inhibitory concentration (cytotoxic) of 50% (IC₅₀) of 19.62 nM. As for NLC-AIPc-40, the IC₅₀ value was 53.84 nM.

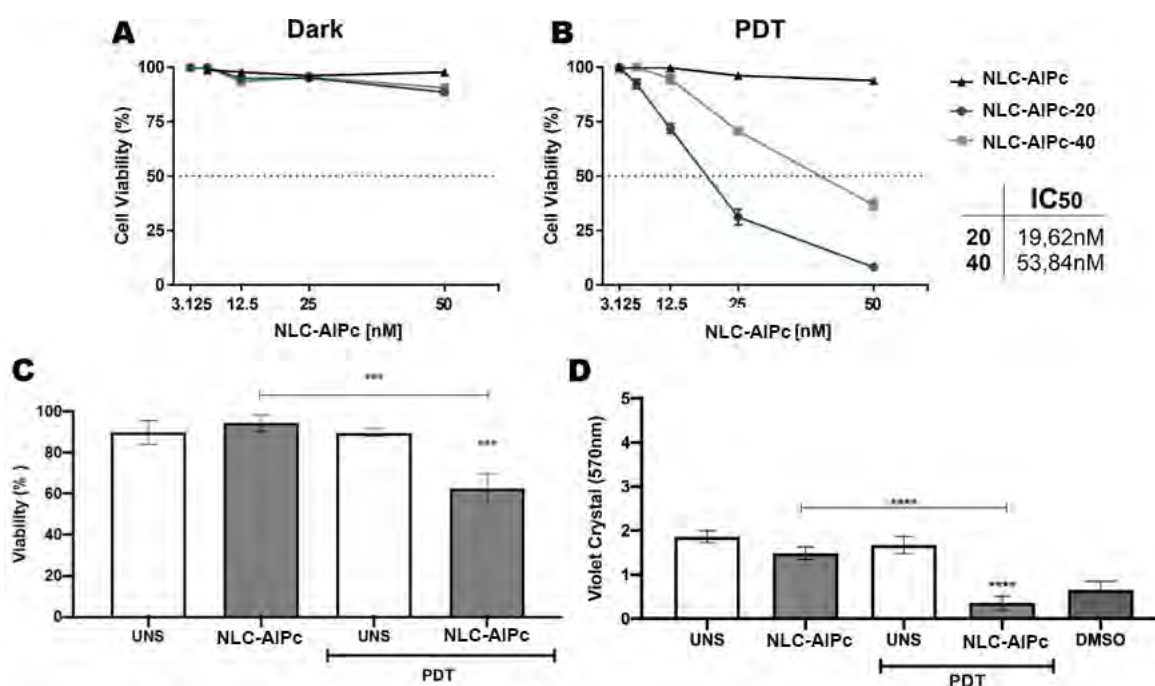


Figure 34 – Cell viability of B16F10. A) Viability analysis of groups without irradiation (MTT), B) Viability analysis after treatments with irradiation (MTT), C) Viability analysis after treatments without irradiation (crystal violet) D) Viability analysis after treatments with irradiation (crystal violet) violet)

Finally, during the PDT evaluation, which involved the exposure of cells to nanocarriers containing AIPc and subsequent exposure to LED, we observed that NLC-AIPc-20 showed better photodynamic activity than NLC-AIPc-40 (Figure 34B). Such behavior can be explained by the fluorescence suppression effect (quenching), already mentioned above. This phenomenon occurs because the nanoscopic confinement created by the nanoparticle allows the carrying of a limited number of photosensitizing molecules. As this concentration is exceeded, phenomena related to molecular aggregation can occur, forming dimers and large aggregates of drugs. Due to this aggregation, the excitation energy of the drugs cannot be transmitted out of the system, creating resonance spaces of the excitation energies created during the photodynamic process.

In summary, in *in vitro* biological experiments, it was found that NLC did not show cytotoxicity. NLC-AIPc-20 and NLC-AIPc-40 demonstrated the absence of toxicity when they are not irradiated (Dark) and a significant reduction in cell viability when subjected to light (LED – 660 nm, 25.88 J/cm²). NLC-AIPc-20 was more efficient in inducing cell death, with

an inhibitory (cytotoxic) concentration of 50% (IC₅₀) of 19.62 nM, against 53.84 nM of IC₅₀ for NLC-AIPc-40. In addition to the MTT test, the crystal violet test was used to confirm the findings of cell viability. The concentration used for the next experiments was the IC₅₀ (19.62 nM) found in the MTT test.

PDT involves three essential components: photosensitizing (PS), light (irradiation) and oxygen. Its action stems from the excitation of the PS by light at a specific wavelength. Then, PS forms reactive oxygen species (ROS) after interacting with molecular oxygen, triggering cytotoxic effects, leading to cell death by oxidative stress and in solid tumors the destruction of tumor microvasculature and activation of antitumor immunity (AGHAJANZADEH *et al.*, 2022c).

The proposed protocol showed a high capacity to produce ROS in B16-F10 cells during treatment, which can be seen in figure 35. Electron paramagnetic resonance and confocal laser fluorescence microscopy, with CellROx staining (fig. 35a and fig. 35b) were used for the analysis. For the test, the ROS of the supernatant (supplementary material 1) and the intracellular ROS (Fig. 35C) were quantified. After confirming the production of ROS by the treatment, we sought to evaluate the morphological changes in the B16-F10 cell line after treatment (fig. 36).

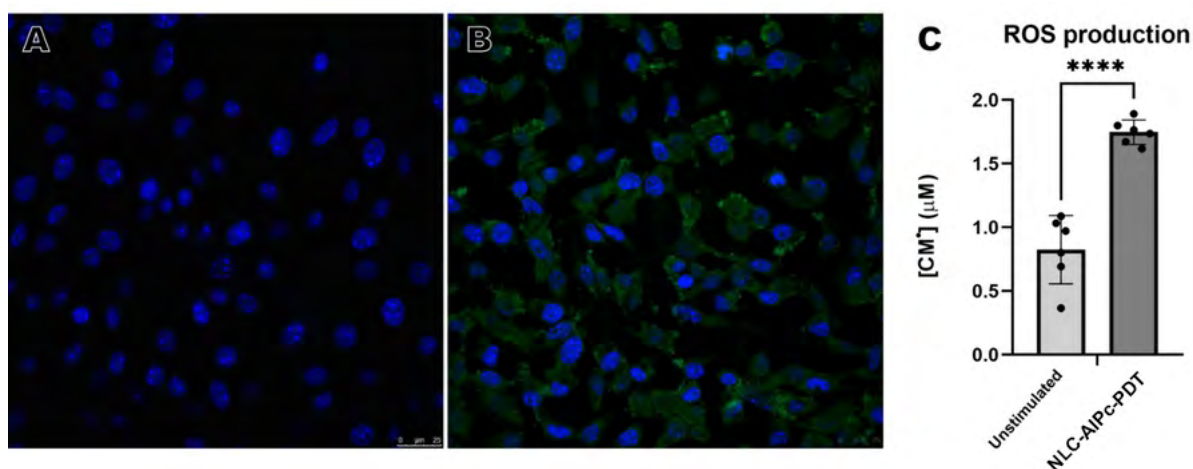


Figure 35 – ROS production. In A and B there are fluorescence micrographs for ROS staining with CellROx staining (green), and Nucleus (blue). In C, the quantification of ROS by Electron paramagnetic resonance is observed.

7.9 Morphology Analysis of Cells Treated with NLC-AIPc-PDT

Morphological analysis of B16-F10 murine melanoma cell cultures by scanning electron microscopy (SEM) and Transmission electron microscopy (TEM) are shown in Figure 36. Important morphological differences are noted when we compared treatment groups. The hypothesis is that treatment with NLC-AIFtCl-PDT causes cell death by apoptosis. Thus, for comparison, the MTX (gold standard for apoptosis) was chosen and treatment

protocol was the one described by (RODRIGUES *et al.*, 2022b).

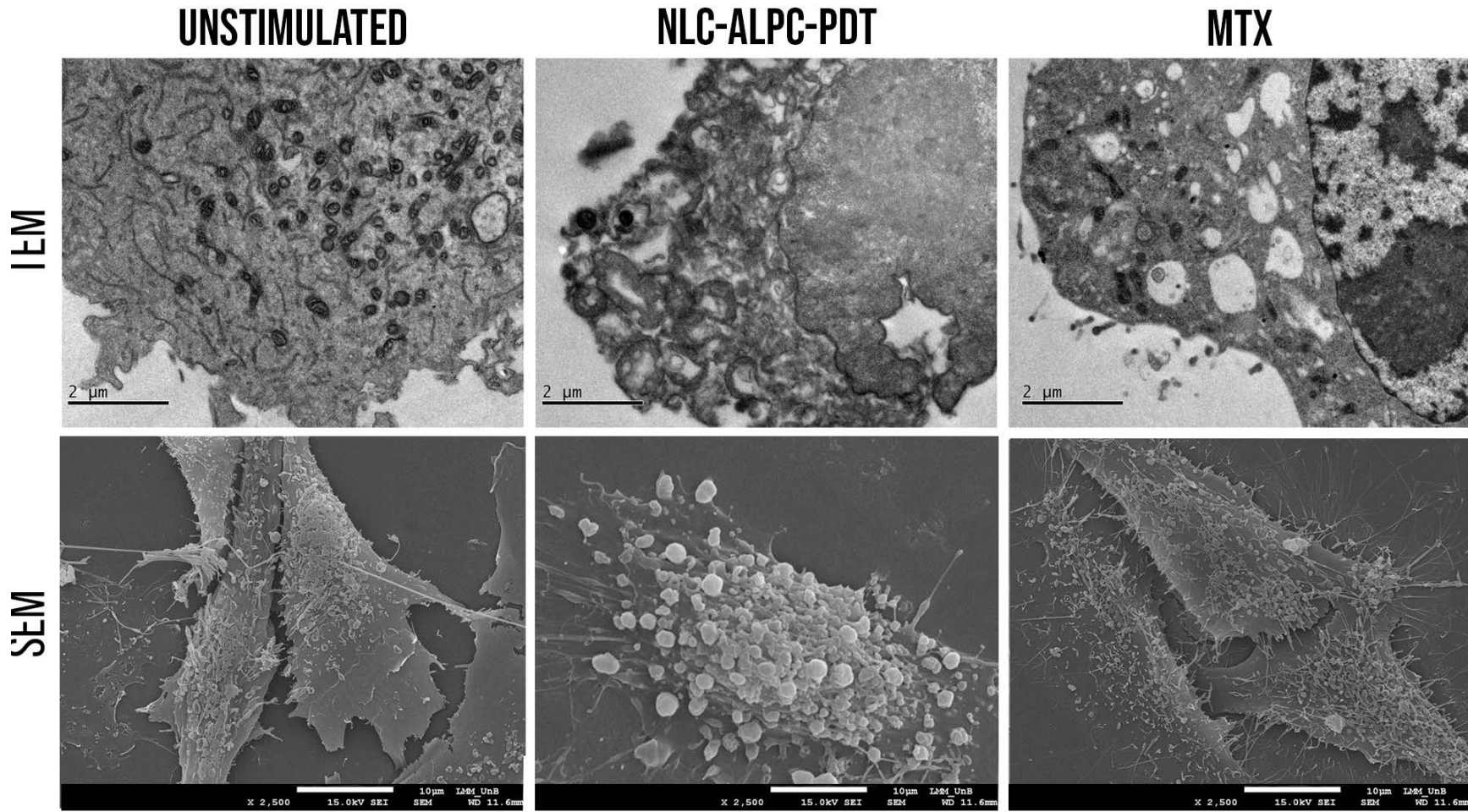


Figure 36 – Morphology Analysis of B16-F10 Treated with NLC-AIPc-PDT. Experimental groups: B16F10 unstimulated (control); B16F10 treated with NLC-AIPc-PDT IC50; Cells treated with MTX as a positive control for apoptosis.

The morphology of treatments with NLC-AIPc-PDT, MTX and unstimulated cells is shown in figure 36. In cells exposed to MTX, a decrease in cell density was observed, typical of shape changes and formation of a large number of vesicles caused by apoptosis and also reduction in the number of cells. It was also possible to observe the formation of apoptotic bodies and cytoplasmic bumps. To confirm the finding, two techniques were performed to understand the mechanism of death triggered by the proposed treatment protocol (NLC-AIPc-PDT). The results are seen in Figure 36. In addition to the type of death caused by the treatment, during the morphological analysis important structural and morphological changes were noted in the B16-F10 cells. It was noticed that the experimental group treated with NLC-AIPc IC50 (Dark) presented an increased melanosome biogenesis when compared to the Group treated with NLC-AIPc followed by irradiation. The mechanisms of melanosome biogenesis can be seen in Figure 37A. Melanosomes have been found at all stages and can be checked in the MET figure 37. There is growing evidence of the importance of oxidative stress in the initiation and progression of melanoma. The role of oxidative stress in melanoma is supported by the findings that mutations in various genes associated with melanoma result in or exacerbate oxidative stress (DENAT *et al.*, 2014; VENZA *et al.*, 2015). In particular, the biogenesis and transport of melanosomes have parallels with the generation and release of secretory organelles in other types of cells, including lysosomes, so to understand a little more about the increased production of melanosomes, the analysis of acidic vesicles that also engulf melanosomes was performed (AKTARY *et al.*, 2021b; SEABRA, 2001b). The result of the analysis can be seen in Figure 37

Analysis was performed in three times after treatment (15 min, 4 h and 24 h), what can be observed is that the cells treated with the IC50 of the NLC-AIPc but were not irradiated had their fluorescence decreased gradually, which did not occur with the group treated with MTX, for example. He had a large fall in fluorescence shortly after treatment, but recovered after 24 hours. The intensity of red fluorescence (Acridine Orange) is proportional to the degree of acidity and/or volume of the cellular acid compartment. Thus, the hypothesis is that treatment with NLC-AIPc triggered a greater biogenesis of melanosomes in response to stress. Melanosomes have the mean PH in 6.8 and as melanosomes are being produced the PH rises and thus the acidity decreases. What explains the reduction in progressive fluorescence.

In addition, an important structural change was found in the B16-F10 scan. The cells treated with IC50 showed a significant change in the number and size of phyllopodias. It is important to remember the phyllopodia phagocytosis model, phyllopodia, which are narrow extensions of the cell membrane, extend from the melanocyte and make contact with a keratinocyte. Melanosomes are transported along the phyllopodiums, which are engulfed by keratinocyte, and phagocytosis will serve as a transport of melanosomes to keratinocytes (AL., 2019b; AKTARY *et al.*, 2021b; BISSIG; ROCHIN; NIEL, 2016c). Mature stage IV melanosomes are transferred from a single melanocyte through dendrites to the cytoplasm of 30 to 40 neighboring keratinocytes, resulting in the spread of melanin pigments throughout the epidermis (BRENNER; HEARING, 2008b). Thus, the literature justifies the alteration found in the analyses of the present study (Fig. 38B). Furthermore, the mechanism involving the maturation of melanosomes and cytoskeleton can be seen in Figure 38A.

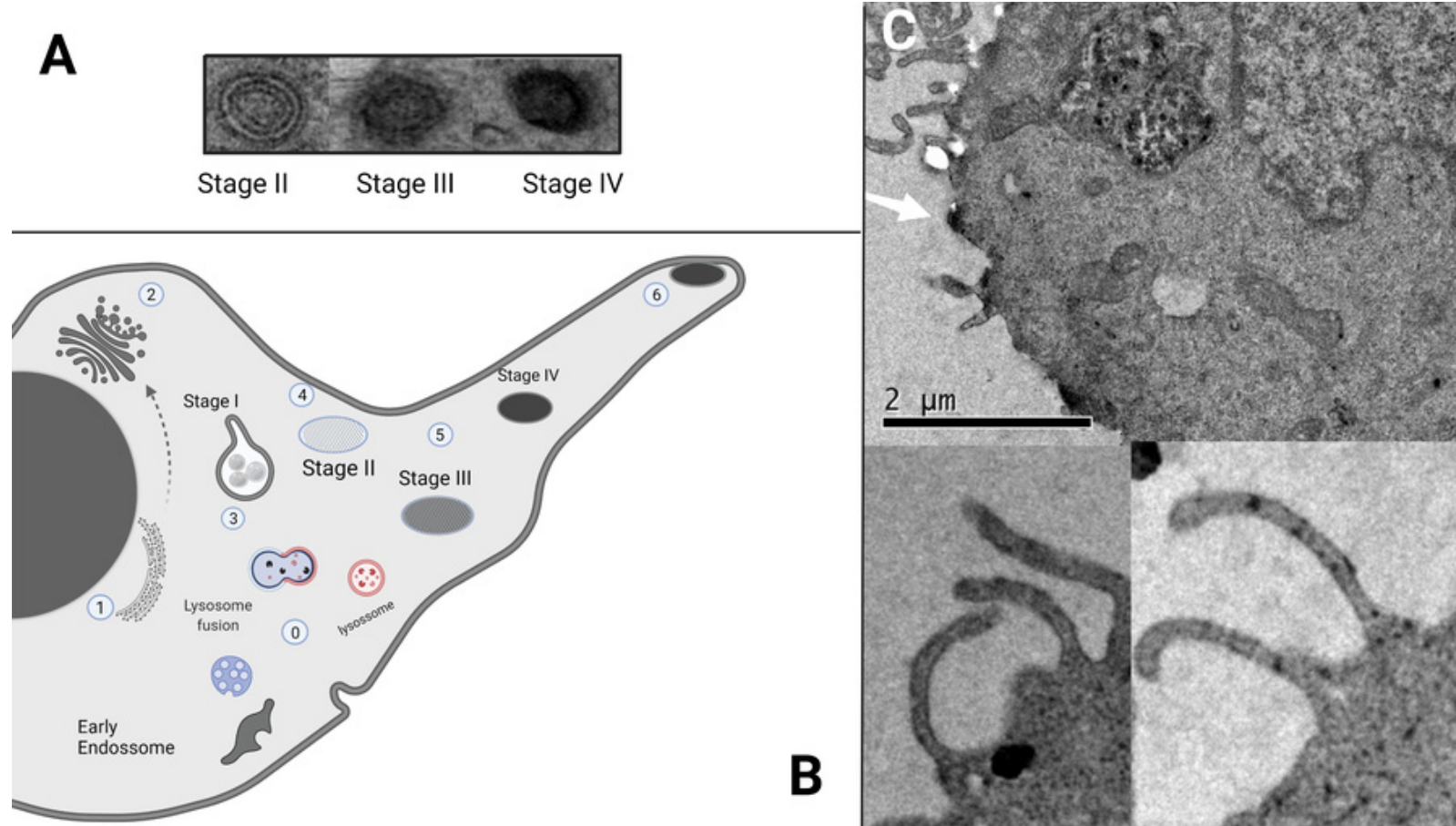


Figure 37 – Melanosome biogenesis. A | Stage II, III and IV of melanosome by TEM. B | Schematic diagram of part of the cell body and dendrite of a melanocyte, with stage I, II, III and IV melanosomes and other indicated organelles. The degree of melanization is indicated by the black color. Vesicles sprouting from the trans-Golgi network contain tyrosinase. C | Electronic transmission micrograph of a melanocyte, which demonstrates the characteristics of melanosomes in stages II, III and IV.

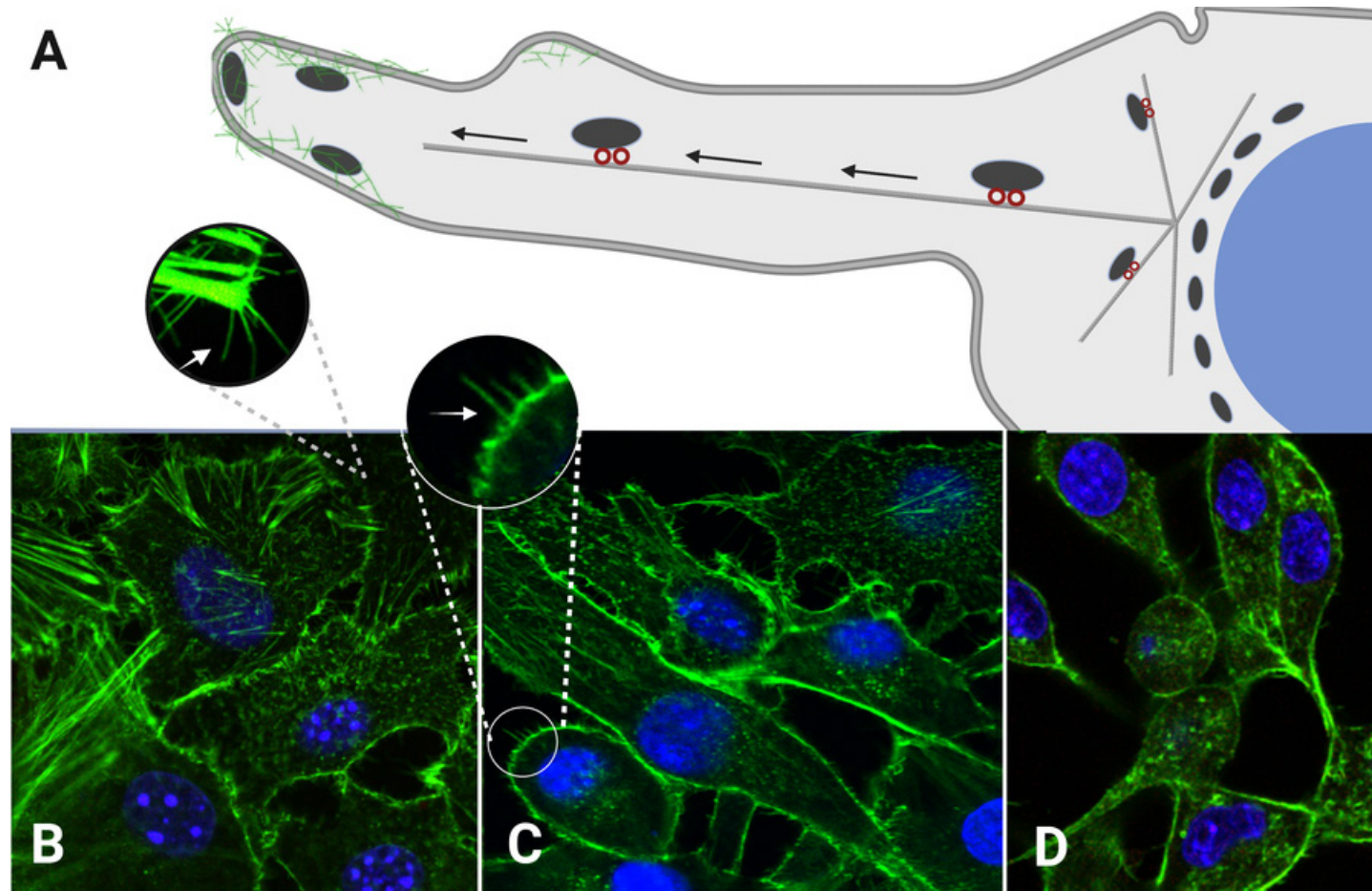


Figure 38 – Cytoskeleton morphology of B16F10. A | Transport of melanosome in epidermal melanocytes. Mature melanosomes in the perinuclear region bind to kinesin (red), a microtubule motor directed by the positive extremity. Melanosomes move along the microtubules (lines) toward the periphery of the cell. Once in the periphery, melanosomes detach from the microtubules and bind to actin filaments (green) through the molecular motor, myosin Va. This stage retains melanosomes at the periphery of the cell, from where they can be transferred to adjacent keratinocytes. B | B16-F10 Treated with NLC-AIFtCl-Dark, presenting a higher number of phyllopodias (arrow), phyllopodia, which are narrow extensions of the cell membrane, extends from the melanocyte and makes contact with a keratinocyte. Melanosomes are transported along the phyllopodiums, which are engulfed by keratinocytes. C | B16-F10 Unstimulated presenting a lower number of phyllopodias (arrow). D | cytoskeleton morphology of B16F10 cells treated with NLC-AIPc-PDT, cells do not show filopodia and have fewer dendrites when compared to other experimental groups.

DNA-damaging agents, such as cisplatin and doxorubicin, are believed to cause changes in mitochondrial potential, either through upregulation of pro-apoptotic molecules, as BAX, through poorly defined mechanisms. As we saw in previous results (Fig. 32), in proposed treatment, PS tends to stay in the nucleus at all times analyzed. The presence of the carrier in the nucleus brings the concern of possible damage to DNA. To confirm that carrier treatment is not DNA-damaging agents, mitochondrial potential alteration tests and DNA fragmentation analysis were performed. The results indicate that even if the colocalization of the NLC-AIPc occurs with the nucleus, there is no significant increase in DNA fragmentation and cell cycle of the analyzed treatments (Fig. 39).

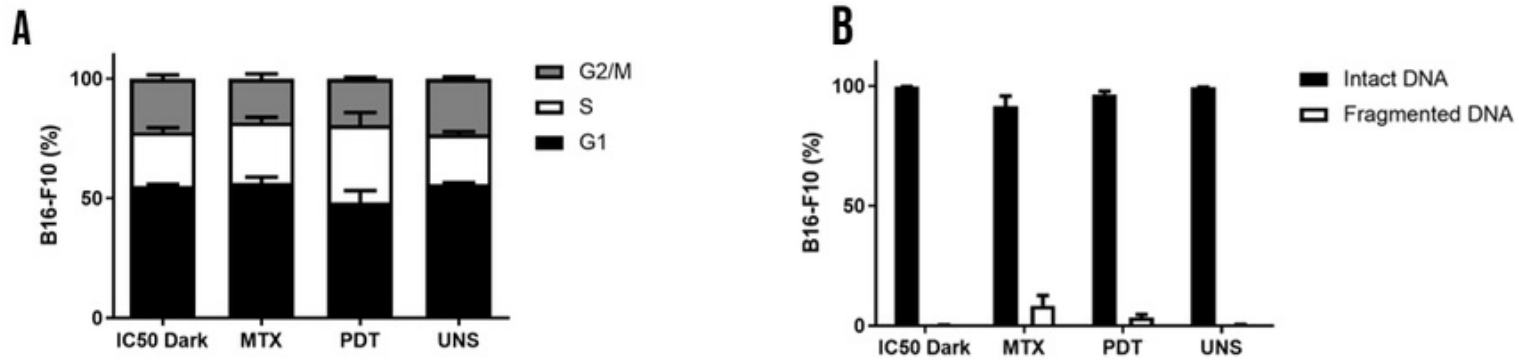
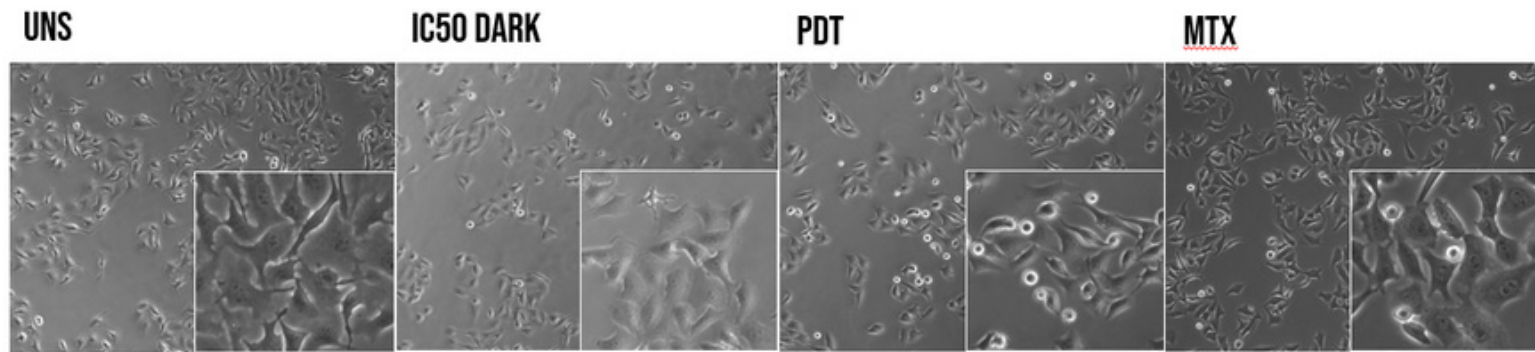


Figure 39 – Cell Cycle (A) and DNA fragmentation of B16-F10 (B)

7.10 NLC-AIPcl-mediated PDT induces apoptosis

Murine melanoma cells (B16-F10), when treated with NLC-AIFtCl-20, showed characteristics of apoptotic bodies and cytoplasmic bump formation similar to those presented by cells treated with mitoxantrone (MTX), suggesting induction of cell death by apoptosis.

Cellular responses stimulated by ROS are diverse. At low concentrations, these species act on cell signaling, influencing processes such as modulation of the expression of cytokines, growth factors and gene expression factors. At high levels, they cause changes in the ionic transport of cells; release of lysosomal hydrolytic enzymes; formation of cytotoxic products; damage to biomolecules such as cholesterol and unsaturated phospholipids in cell membranes, proteins in various amino acid residues, and nitrogenous bases in nucleic acids; and, finally, induction of cell death by necrosis, apoptosis or autophagy (PORTER; JÄNICKE, 1999; HERSEY; ZHANG, 2001; USUDA *et al.*, 2004)

Death by necrosis occurs after severe and uncontrolled damage to various cellular structures, which causes loss of homeostatic control, increases cell volume, interrupts of mitochondrial function and disruption of cell membrane, resulting in the release of intracellular content in the tissue and damage neighbor cells and cause an intense inflammatory response. In death by apoptosis, there is a decrease in cell volume with nuclear and cytoplasmic condensation, which cause loss of adherence with the extracellular matrix and with neighbor cells. During apoptosis, chromatin is condensed, chromosomal DNA is cleaved by endonucleases, forming apoptotic bodies, which are phagocytosed by macrophages (MCCONKEY, 1998). It is important to highlight that cell death mechanisms are not independent, there may be multiple mechanisms acting simultaneously (LEE *et al.*, 2009; HERSEY; ZHANG, 2001)

It is important to highlight that cell death mechanisms are not independent, there may be multiple mechanisms acting simultaneously (LEE *et al.*, 2009; HERSEY; ZHANG, 2001) The autophagic cellular response was related to the intensity of the PDT stimulus and, consequently, to the level of oxidative stress generated. At low light intensities, autophagy works by ensuring the removal of damaged cell components, preventing the start of apoptotic pathways. Thus, ensure cell viability. At medium doses of PDT, both apoptosis and autophagy can contribute to cell death and in very high doses of PDT, the occurrence of necrosis is observed (RODRIGUES *et al.*, 2022).

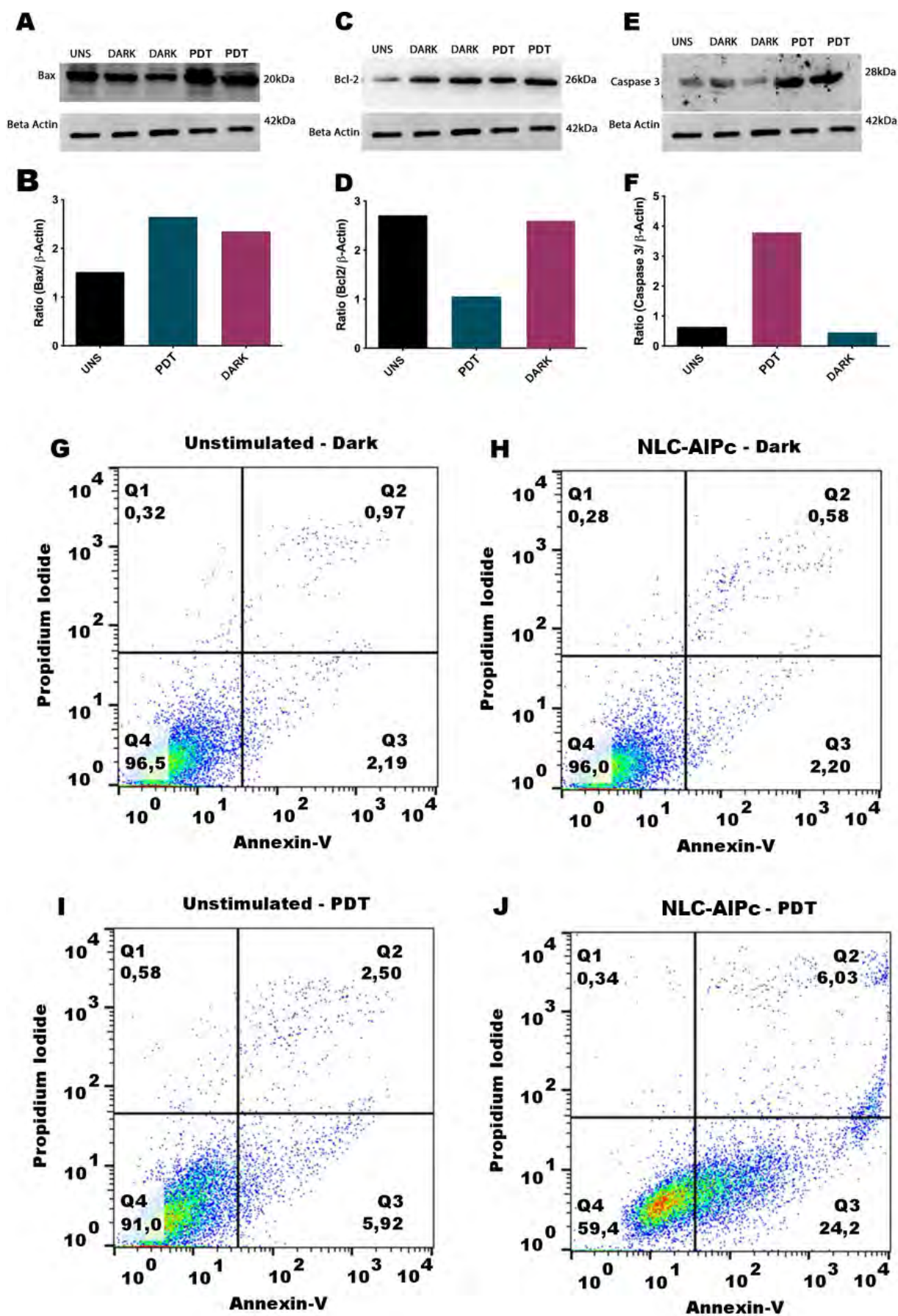


Figure 40 – NLC-AIPc-mediated PDT induces apoptosis.

As seen in Figure 41F, treatment with NLC-AIPc-PDT triggered a high expression of Caspase 3 (pro-apoptotic) and a lower expression of Bcl2 (anti-apoptotic). The execution of apoptosis is mainly related to Caspase 3 and the Bcl2 family. Current evidence suggests that there are several distinct pathways for caspase activation, depending on the stimulus that triggers the death machinery, and, in general, two distinct pathways can be active. Apoptosis is initiated via death receptors such as Fas. However, apoptotic stimuli induced by many anticancer therapies can act in another way (PORTER; JÄNICKE, 1999; HERSEY; ZHANG, 2001)

Activation of caspases promotes the appearance of cellular changes that characterize apoptosis, such as disassembly of the nuclear membrane and lamina scaffold, chromatin hypercondensation and proteolytic degradation of nuclear and cytoplasmic structures. These changes are common to all cells in explicit apoptosis, regardless of the agent inducing the process. This means that the action of these caspases represents a final common pathway that operates in all cells programmed to die (THORNBERRY; LAZEBNIK, 1998*; HENGARTNER, 2000*)(PORTER; JÄNICKE, 1999).

According to (GARG *et al.*, 2014), PDT can promote the activation of death by apoptosis through the activation of caspases – cysteine-dependent aspartate-specific proteases. Caspases can trigger apoptosis and are responsible for cleaving into by-products, thus leading to nuclear condensation and fragmentation, activation of proteins such as BAX, and decrease the expression of apoptosis-inhibiting proteins as Bcl-2. In addition to exposure of phospholipids in the membrane, such as phosphatidylserines, which will be responsible for signaling to immune system cells (RODRIGUES *et al.*, 2022).

In the present study, the exposed phospholipid phosphatidylserine was identified in B16-F10 cells submitted to the PDT protocol after 24 hours of treatment. Analysis of treatments and controls can be seen in Figure 40. To confirm and detail the type of death caused by the proposed treatment, Bax, Caspase 3 and Bcl2 proteins were quantified by western blotting. The results can be seen in figure 40b, 40d and 40f.

A wide variety of stimuli can induce apoptosis, including oxidative stress caused by the generation of oxidative intermediates through the action of different therapies, such as photodynamic therapy. The induction mechanism can be via exposure to hydrogen peroxide, redox-cyclization of quinones or thiol-alkylating agents. A huge amount of data supports the role of oxidative stress in triggering apoptosis, with classical apoptotic pathways involving a moderate accumulation of reactive oxygen species (RODRIGUES *et al.*, 2022; GARG; AGOSTINIS, 2014).

As happens with calcium, oxidative stress can inhibit or promote apoptosis and even necrosis, depending on the intensity of the stimulus. The redox state of cells is a consequence of the balance between the levels of reactive oxygen species (ROS), oxidizing and reducing equivalents. Elevation in ROS levels above the buffering capacity and enzymatic activity designed to modulate the levels of these species results in potentially cytotoxic oxidative

stress. Under this pro-oxidant condition, highly reactive radicals can damage DNA, RNA, proteins and lipid components, which can lead to cell death (GARG; AGOSTINIS, 2014; GARG *et al.*, 2014).

7.11 NLC-AIPc generates reversion of immunosuppression in B16-F10

Although PDT has been used successfully in the treatment of cancer and non-neoplastic diseases, its use in the treatment of melanoma patients has been limited due to low response rates and unsatisfactory efficiency. Immune tolerance in the tumor microenvironment reduces the tumor-killing capacity of immune cells and promotes tumor cell growth. Thus, the reversal of immunosuppression in the tumor microenvironment is currently a research area of great importance. PDT can increase antitumor immune responses, inducing oxidative stress, which can trigger the release of pro-inflammatory factors such as TNF, interleukin IL-6, and IL-1. Therefore, PDT protocols that act in the reversal of immunosuppression in the tumor microenvironment are promising. Furthermore, protocols that act by recruiting innate immune cells, which will be recruited to the treatment site by these inflammatory cytokines, will act to overcome melanoma resistance against PDT. Thus, the last step of the present work was to verify if the proposed PDT protocol can recruit the immune system against melanoma. In figure 40A, a large increase in the production of IL-1 β , one of the main pro-inflammatory cytokines, is observed. The results obtained indicate that the NLC-AIPc-PDT protocol generates a higher release even than the treatment with MTX, which is the gold standard for immunogenic cell death. Then, we sought to verify whether the proposed treatment would increase the response of phagocytes against the B16-F10 cell line after being treated (Fig. 41B). The result was surprising. Cells treated with the NLC-AIPc (blue line) protocol increased the phagocytic activity of dendritic cells in ways that were superior to the other experimental groups. A curious fact to be observed is that untreated B16-F10 cells (Red Line), when exposed to dendritic cells, did not generate an increase in activity, in fact showing the tumor immunoevasion of B16-F10.

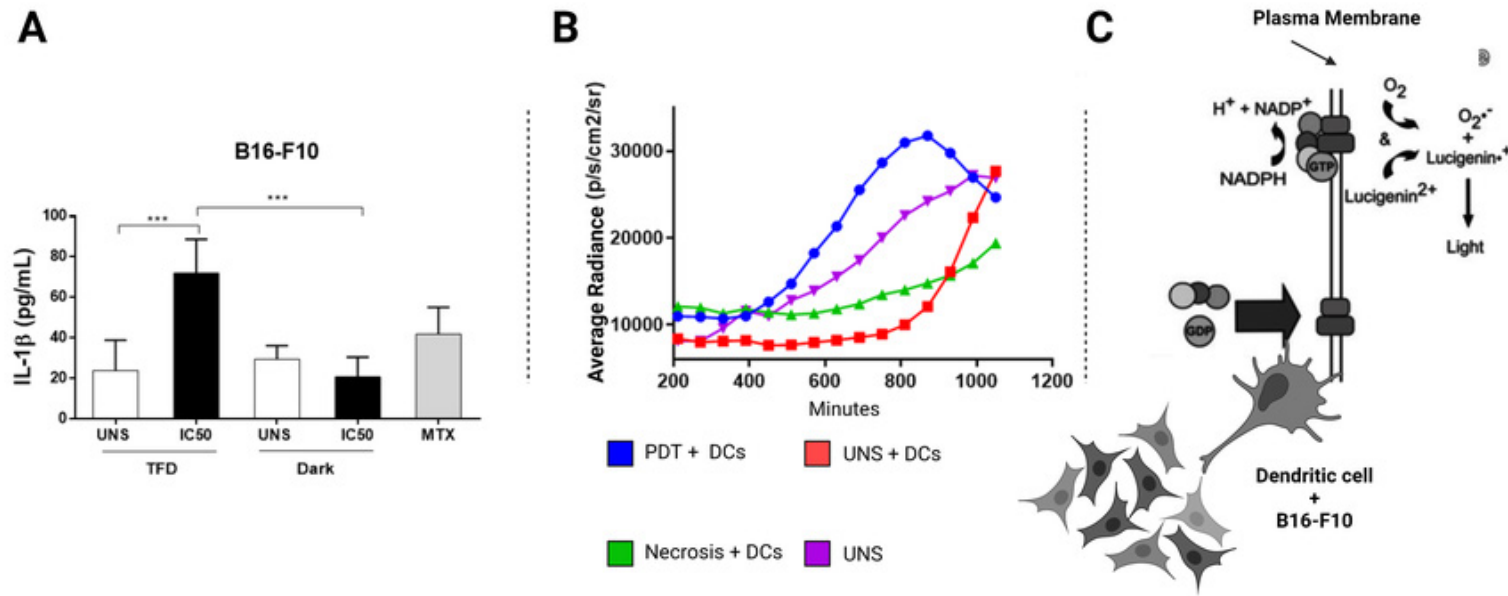


Figure 41 – Immunogenic response analysis after treatment with NLC-AIPc. A) IL-1b B release profile)Nadph oxidase activity analysis in dendritic cells after interaction with treated cells C) Lucigenin mechanism for quantification of NADPH oxidase of phagocytes. The lucigeninescence chemiluminescence reaction involves the reduction of a single lucigenin electron to form the cationic radical lucigenin, which in turn reacts with the superoxide anion to produce light. Superoxide alone is unable to reduce lucigenin. An additional reducing agent, such as NADH or NADPH, is required to measure the level of superoxide anion. In phagocytes, Phox bound to the plasma membrane can achieve the reduction of a single extracellular lucigenin electron using intracellular NADPH as an electron donor.

8 CONCLUSION

This study indicates the NLC developed is a potential carrier system for carrying photosensitizer (PS). The morphology of the NLC is cuboid and the carrier's, which contains AIPc (NLC-AIPc), is spherical. AIPc, which is extremely hydrophobic, has physically interacted with the mixture of lipid and surfactant, preventing the formation of crystals during the cooling of the formulation. The results categorize the developed carrier into the structure subtype of NLC, also known as amorphous type. NLC-AIPc proved to be a great third-generation photosensitizer, due to its unique structure (amorphous), there is no crystallization of lipids, thus AIPc remains embedded in the amorphous matrix offering a greater load of the photosensitizer and increasing its stability during storage. After 3 months of storage at different temperatures the mean diameters and Pdl of SLN and NLC remain practically the same.

An *in vitro* protocol of photodynamic therapy mediated by the third generation PS (NLC-AIPc) was developed, the protocol demonstrated results of great relevance in the murine melanoma model. Our results suggest that the internalization of the carrier is mainly done by the Macropinocytosis route, with remodeling of the cytoskeleton. The NLC-AIPc enters the cell and with 15 minutes has a great presence in the cell nucleus, something relatively new in the literature. Even present in the nucleus, our results indicate that there is no dna damage or fragmentation make by the NLC-AIPc. When not irradiated, the nanocarrier does not cause cellular damage, which is an important fact for photodynamic therapy protocols, since they aim cytotoxicity only when irradiation occurs.

The presence of NLC-AIPc in the nucleus may be something relevant to circumvent melanoma resistance to PDT, since the cell type produces melanin that has high antioxidant capacity and offers great protection against oxidative stress to the cell, and especially to the cell nucleus. The proposed protocol can circumvent this resistance, showing the front of other PDT protocols.

The treatment generates reactive oxygen species, ignoring the antioxidant action of melanin produced by the cell, causing relevant cell damage and with extremely low concentrations of PS ($IC_{50}=19.62nM$). The type of cell death caused by the proposed treatment is apoptosis. The type of death caused is extremely relevant because in this type of death, there may be release of patterns and cytokines that can recruit the immune system, type of death named immunogenic cell death, which will be studied in the next phases of the work.

The present work also studied mechanisms of melanosomes after stress caused by the experimental groups, bringing significant results that will continue to be studied in close studies of the group. Finally, the present study aimed to seek answers when the possible activation of the immune system after the PDT mediated by the third generation FS developed. The results for production of IL-1 β , the main pro inflammatory cytokine,

and activation of dendritic cells, were impressive. Demonstrating strong action in another mechanism to overcome melanoma resistance.

REFERÊNCIAS

- AGHAJANZADEH, M. *et al.* **Synergic Antitumor Effect of Photodynamic Therapy and Chemotherapy Mediated by Nano Drug Delivery Systems.** 2022a.
- AKTARY, Z. *et al.* A role for Dynlt3 in melanosome movement, distribution, acidity and transfer. v. 4, n. 1, 12 2021a.
- AL., B. D. *et.* Melanoma treatment in review. **Immunotargets Ther.**, v. 7, n. 0, p. 35 – 49, 06 2018a. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5995433/>.
- AL., C. J. M. *et.* Mohs Micrographic Surgery for Melanoma As Use Increases, So Does the Need for Best Practices. **JAMA Dermatol**, v. 155, n. 11, p. 1225 – 1226, 08 2018.
- AL., M. W. *et.* The physiology of melanin deposition in health and disease. **Clinics in dermatology**, v. 37, n. 5, p. 402 – 417, 10 2019b.
- ALI, H. H. *et al.* Shea butter solid nanoparticles for curcumin encapsulation: Influence of nanoparticles size on drug loading. **Eur. J. Lipid Sci. Technol.**, v. 117, n. 1, p. 0000 – 0000, 11 2019.
- APPOLLONI, A. *et al.* Green recovery in the mature manufacturing industry: The role of the green-circular premium and sustainability certification in innovative efforts. v. 193, 3 2022.
- ARAUJO, V. H. S. *et al.* The influence of NLC composition on curcumin loading under a physicochemical perspective and in vitro evaluation: Physicochemical and Engineering Aspects. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 602, n. 5, p. 1 –, 10 2020.
- ARORA, H. C. *et al.* Nanocarriers Enhance Doxorubicin Uptake in Drug-Resistant Ovarian Cancer Cells. **Cancer research**, v. 72, n. 3, p. 769 – 778, 2 2012. ISSN 0008-5472. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3657469/>.
- ASCHEMANN-WITZEL, J.; STANGHERLIN, I. D. C. Upcycled by-product use in agri-food systems from a consumer perspective: A review of what we know, and what is missing. v. 168, p. 120749 –, 7 2021. Acesso em: 2022-04-13T00:00:00+00:00.

- BALDEA, I. et al. Photodynamic Therapy in Melanoma - Where do we Stand? **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, n. 40, p. 5540 – 5563, 0 2018a.
- BELOQUI, A. *et al.* Fate of nanostructured lipid carriers (NLCs) following the oral route: Design, pharmacokinetics and biodistribution. v. 31, n. 1, p. 1 – 8, 2014a. Acesso em: 2022-03-04T00:00:00+00:00.
- BERSON, J. F. *et al.* Proprotein convertase cleavage liberates a fibrillogenic fragment of a resident glycoprotein to initiate melanosome biogenesis. v. 161, n. 3, p. 521 – 533, 5 2003.
- BEZERRA, M. A. *et al.* Contribuições e perspectivas da pesquisa brasileira sobre plantas alimentícias silvestres com foco no semiárido. v. 77, p. e2022003 – e2022003, 1 2022.
- BISSIG, C.; ROCHIN, L.; NIEL, G. van. **PMEL amyloid fibril formation**: The bright steps of pigmentation. 2016a.
- BOO, Y. C. Up- or Downregulation of Melanin Synthesis Using Amino Acids, Peptides, and Their Analogs. **Biomedicines**, v. 8, n. 9, p. 322 – 322, 09 2020.
- BRENNER, M.; HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochemistry and photobiology**, v. 84, n. 3, p. 539 – 549, 2008a. ISSN 0031-8655. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671032/>.
- BRENNER, M.; HEARING, V. J. The Protective Role of Melanin Against UV Damage in Human Skin. **Photochemistry and photobiology**, v. 84, n. 3, p. 539 – 549, 2008b. ISSN 0031-8655. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671032/>.
- CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 1, n. 1, p. 240 – 247, July 2016.
- CAMPOS, R.; MARANGONI, A. G. Molecular Composition Dynamics and Structure of Cocoa Butter. **Crystal Growth & Design**, v. 10, n. 1, p. 205 – 217, 10 2010.
- CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. v. 1, n. 4, p. 279 – 293, 12 2004.

- CHEN, H. *et al.* **Podophyllotoxin-loaded solid lipid nanoparticles for epidermal targeting.** v. 110, n. 2, p. 296 – 306, 1 2006.
- CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. **Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems.** v. 17, n. 5, p. 272 – 283, 5 2006.
- CHIZENGA, E. P.; ABRAHAMSE, H. **Nanotechnology in modern photodynamic therapy of cancer: A review of cellular resistance patterns affecting the therapeutic response.** 2020. 1 – 21 p.
- CONTE, C. *et al.* **Polymeric Nanoparticles for Cancer Photodynamic Therapy.** In: CONTE, C. *et al.* (Ed.). [S.l.: s.n.], 2016. p. 61 – 112.
- CORRIAS, F.; LAI, F. **New Methods for Lipid Nanoparticles Preparation.** v. 5, n. 3, p. 201 – 213, 9 2011.
- DAS, S.; NG, W. K.; TAN, R. B. **Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs?** v. 47, n. 1, p. 139 – 151, 8 2012a. Acesso em: 2022-04-12T00:00:00+00:00.
- DENAT, L. *et al.* **Melanocytes as Instigators and Victims of Oxidative Stress.** **The Journal of investigative dermatology**, v. 134, n. 6, p. 1512 – 1518, 6 2014. ISSN 0022-202X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4418514/>.
- EDREI, R. *et al.* **Sulfonated Phthalocyanines: Photophysical Properties, in vitro Cell Uptake and Structure-activity Relationships.** **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 2, n. 3, p. 191 – 199, 0 1998.
- ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. **Optimization of Spray-Dried and -Congealed Lipid Micropellets and Characterization of Their Surface Morphology by Scanning Electron Microscopy.** v. 8, n. 1, p. 47 – 54, 1991. Acesso em: 2022-04-12T00:00:00+00:00.
- FALCONE, S. *et al.* **Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events.** v. 119, n. 22, p. 4758 – 4769, 11 2006.
- FAO. **Desperdiço de alimentos tem consequências no clima, na água, na terra e na biodiversidade.** 2000a. Disponível em: <http://www.fao.org/daccatb.asp>. Acesso em: 04/03/2022.
- FERREIRA, S. T.; VIEIRA, M. N.; FELICE, F. G. D. **Soluble protein oligomers as emerging toxins in Alzheimer's and other amyloid diseases.** In: . [S.l.: s.n.], 2007. v. 59, n. 4-5, p. 332 –

- GANASSIN, R. *et al.* Solid lipid nanoparticles loaded with curcumin: Development and in vitro toxicity against CT26 cells. v. 17, n. 3, p. 167 – 179, 2 2022a
- GARTI, N.; SATO, K. Crystallization and polymorphism of fats and fatty acids. **Marcel Dekker Inc**, v. 2, p. 227 – 266, 1988.
- GARUD, A.; SINGH, D.; GARUD, N. Solid Lipid Nanoparticles (SLN): Method, Characterization and Applications. **International Current Pharmaceutical Journal**, v. 1, n. 11, p. 384 – 393, 2012.
- 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. v. 36, n. 1, p. 43 – 52, 1 2019.
- GORDILLO-GALEANO, A.; MORA-HUERTAS, C. E. **Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: A review emphasizing on particle structure and drug release.** v. 133, p. 285 – 308, 12 2018a.
- GUNSTONE, F. D.; PADLEY, F. B. (ed.). **Lipid technologies and applications.** [S.l.]: The library of Congress, 1997.
- HAASS, C.; SELKOE, D. J. **Soluble protein oligomers in neurodegeneration:** Lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. 2007. 101 – 112 p.
- HERSEY, P.; ZHANG, X. D. **How melanoma cells evade trail-induced apoptosis.** v. 1, n. 2, p. 142 – 150, 11 2001.
- HU, C. J.; ZHANG, L. **Nanoparticle-based combination therapy toward overcoming drug resistance in cancer.** **Biochem Pharmacol.**, v. 83, n. 8, p. 1104 – 1111, 04 2012.
- INCA. **Estimativa 2020:** Incidência de Cancer no Brasil. RIO DE JANEIRO: Serviço de Educação e Informação Técnico-Científica Área de Edição e Produção de Materiais Técnico-Científicos, 2020. 120 p. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil.pdf>. Acesso em: 05/08/2021.

- JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, v. 15, n. 83, p. 153 – 178, Janeiro 2016.
- JONES, A. T. Macropinocytosis: searching for an endocytic identity and role in the uptake of cell penetrating peptides. v. 11, n. 4, p. 670 – 684, 7 2007.
- JUANZHANG *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, 03 2018.
- KATIPAMULA, R.; MARKOVIC, S. N. Emerging therapies for melanoma. **Expert Rev Anti-cancer Ther.**, v. 8, n. 4, p. 553 – 560, 04 2008.
- KHAN, Z. U. *et al.* Physicochemical Characterizations and Pharmacokinetic Evaluation of Pentazocine Solid Lipid Nanoparticles against Inflammatory Pain Model. v. 14, n. 2, 2 2022b.
- KORBELIK, M. *et al.* Calreticulin as Cancer Treatment Adjuvant: Combination with Photodynamic Therapy and Photodynamic Therapy-Generated Vaccines. **Frontiers in Oncology**, v. 5, n. February, p. 1 – 8, 2015.
- KOROLEVA, M. *et al.* Solid lipid nanoparticles and nanoemulsions with solid shell: Physical and thermal stability. v. 610, p. 61 – 69, 3 2022.
- KUDARHA, R. *et al.* Box-Behnken study design for optimization of bicalutamide-loaded nanostructured lipid carrier: stability assessment. **Pharm Dev Technol**, v. 20, n. 5, p. 608 – 618, maio 2015.
- LEE, J. *et al.* Nanosized polyamidoamine (PAMAM) dendrimer-induced apoptosis mediated by mitochondrial dysfunction. **Toxicol. Lett.**, v. 190, p. 202 – 207, 2009.
- LIM, J. P.; GLEESON, P. A. Macropinocytosis: an endocytic pathway for internalising large gulps. v. 89, n. 8, p. 836 – 843, 11 2011.
- LLOYD-HUGHES, H.; SHIATIS, A. E.; PABARI, A. Current and Future Nanotechnology Applications in the Management of Melanoma: A Review. v. 06, n. 06, 2015.
- LOPES, D. G. *et al.* Role of Lipid Blooming and Crystallite Size in the Performance of Highly Soluble Drug-Loaded Microcapsules. v. 104, n. 12, p. 4257 – 4265, 12 2015.
- MACKAY, M. E. *et al.* General Strategies for Nanoparticle Dispersion. v. 311, n. 5768, p. 1740 – 1743, 3 2006.
- MARQUES, A. M. *et al.* Piper tectoniifolium Kunth: A New Natural Source of the Bioactive Neolignan (-)-Grandisin. v. 27, n. 4, 2 2022.
- MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications. v. 64, n. SUPPL., p. 83 – 101, 12 2012. Acesso em: 2022-04-12T00:00:00+00:00.

- MORAIS, J. A. V. *et al.* The induction of immunogenic cell death by photodynamic therapy in B16F10 cells in vitro is effected by the concentration of the photosensitizer. v. 35, p. 102392 –, 9 2021.
- 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, 2015a.
- MUSIELAK, E.; FELICZAK-GUZYK, A.; NOWAK, I. Synthesis and Potential Applications of Lipid Nanoparticles in Medicine. **Materials**, v. 15, n. 15, p. 1 – 28, Janeiro 2022.
- NASCIMENTO FILHO, W. B. do; FRANCO, C. R. Avaliação do Potencial dos Resíduos Produzidos Através do Processamento Agroindustrial no Brasil. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 1968 – 1987, 0 2015.
- PARHI, P.; MOHANTY, C.; SAHOO, S. K. Nanotechnology-based combinational drug delivery: An emerging approach for cancer therapy. v. 17, n. 17-18, p. 1044 – 1052, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.drudis.2012.05.010>.
- PATEL, D. K.; KESHARWANI, R.; KUMAR, V. Lipid Nanoparticle Topical and Transdermal Delivery: A Review on Production, Penetration Mechanism to Skin. v. 9, n. 4, p. 148 – 153, 12 2019.
- PORTER, A. G.; JÄNICKE, R. U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. v. 6, n. 2, p. 99 – 104, 2 1999.
- RAPOSO, G. *et al.* **Distinct Protein Sorting and Localization to Premelanosomes, Melanosomes, and Lysosomes in Pigmented Melanocytic Cells 7.** [S.l.], 2001. 809 – 823 p. Disponível em: <http://www.jcb.org/cgi/content/full/152/4/809>.
- RIBEIRO, L. N. M. *et al.* Natural lipids-based NLC containing lidocaine: from pre-formulation to in vivo studies. **Eur J Pharm Sci** ., v. 106, p. 102 – 112, 08 2017.
- RIBEIRO, S. C.; SOARES FILHO, B. **Opportunities of the Nagoya Protocol to nurture the use of native species in Brazil.** v. 127, p. 321 – 324, 1 2022b.
- RODRIGUES, M. C. **Terapia fotodinâmica mediada por extrato de cajuru e cloreto de alumínio-ftalocianina em nanoemulsões no tratamento de câncer de mama in vitro.** 2014.

- RODRIGUES, M. C. *et al.* Induction of Immunogenic Cell Death by Photodynamic Therapy Mediated by Aluminum-Phthalocyanine in Nanoemulsion. v. 14, n. 1, 1 2022.
- ROMERO, M. P. *et al.* Photophysical properties and photodynamic activity of a novel menthol-zinc phthalocyanine conjugate incorporated in micelles. v. 253, p. 22 – 29, 2 2013. Acesso em: 2022-04-12T00:00:00+00:00.
- SALVI, V. R.; PAWAR, P. Nanostructured lipid carriers (NLC) system: A novel drug targeting carrier. v. 51, p. 255 – 267, 6 2019. Acesso em: 2022-04-03T00:00:00+00:00.
- SCHAFERKORTING, M.; MEHNERT, W.; KORTING, H. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. v. 59, n. 6, p. 427 – 443, 7 2007.
- SCHÖLER, N. *et al.* Surfactant, but not the size of solid lipid nanoparticles (SLN) influences viability and cytokine production of macrophages. v. 221, n. 1-2, p. 57 – 67, 6 2001. Acesso em: 2022-04-12T00:00:00+00:00.
- SEABRA, M. S. M. M. C. The melanosome: membrane dynamics in black and white. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, n. 0, p. 738 – 748, 10 2001.
- SERRA, J. L. *et al.* Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocols, total carotenoids and chemical composition. v. 116, p. 12 – 19, 2 2019a.
- SHANGGUAN, M. *et al.* Binary lipids-based nanostructured lipid carriers for improved oral bioavailability of silymarin. v. 28, n. 6, p. 887 – 896, 2 2014. Acesso em: 2022-03-04T00:00:00+00:00.
- SINGH, V. V. Green nanotechnology for environmental remediation. p. 31 – 61, 1 2022.
- SKIRYCZ, A. *et al.* **Medicinal Bioprospecting of the Amazon Rainforest: A Modern Eldorado?** 2016a. 781 – 790 p.
- SONODA, T. *et al.* Effects of emulsifiers on crystallization behavior of lipid crystals in nanometer-size oil-in-water emulsion droplets. v. 6, n. 1, p. 306 – 312, 1 2006.

THRANDUR, H. *et al.* Impact of surfactant properties on oxidative stability of β -carotene encapsulated within solid lipid nanoparticles. v. 57, n. 17, p. 8033 – 8040, 9 2009.

URBAN, C. *et al.* Externally modulated theranostic nanoparticles. **Translational cancer research**, v. 2, n. 4, p. 292 – 308, 8 2013. ISSN 2218-676X. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4019206/>.

USUDA, J. *et al.* Promotion of Photodynamic Therapy-Induced Apoptosis by the Mitochondrial Protein Smac/DIABLO: Dependence on Bax η . v. 76, n. 2, p. 217 –, 2004.

VENZA, M. *et al.* Cellular Mechanisms of Oxidative Stress and Action in Melanoma. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Hindawi Publishing Corporation, v. 2015, p. 481782 –, 2015. ISSN 1942-0900. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4438193/>.

WATT, B. *et al.* PMEL: A pigment cell-specific model for functional amyloid formation. v. 26, n. 3, p. 300 – 315, 5 2013.

WESTESEN, K.; BUNJES, H. Do nanoparticles prepared from lipids solid at room temperature always possess a solid lipid matrix? v. 115, n. 1, p. 129 – 131, 2 1995. Acesso em: 2022-04-12T00:00:00+00:00.

YU, Q. *et al.* Lipids-based nanostructured lipid carriers (NLCs) for improved oral bioavailability of sirolimus. v. 23, n. 4, p. 1469 – 1475, 5 2016. Acesso em: 2022-03-04T00:00:00+00:00.

ZHANG, J. *et al.* Synthesis and evaluation of new potential benzo[a]phenoxazinium photosensitizers for anticancer photodynamic therapy. **Molecules**, v. 23, n. 6, p. 1436 –, 2018.