



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
Departamento de Química
Programa de Pós-Graduação em Química

**“Desenvolvimento de nanopartículas protéicas polimerizadas para
veiculação de fotoativos aplicáveis ao tratamento de câncer do sistema
nervoso central”.**

Nathalia Nossi Davanzo

Dissertação apresentada à Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do
título de Mestre em Ciências, Área: **Química**

Orientador: Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco

RIBEIRÃO PRETO -SP

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Davanzo, Nathalia Nossi

Desenvolvimento de nanopartículas protéicas polimerizadas para veiculação de fotoativos aplicáveis ao tratamento de câncer do sistema nervoso central, Ribeirão Preto, 2016.

p.91 : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Química.

Orientador: Tedesco, Antonio Claudio.

1. Terapia Fotodinâmica. 2. Nanopartícula de Albumina. 3. Ftalocianina de cloro alumínio. 4. Curcumina.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco pela confiança, orientação, aprendizado e pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Fernando Lucas Primo que sempre me orientou, dando conselhos durante o desenvolvimento do trabalho.

Aos meus pais, Maria Vanilde e Irineu, por seu amor incondicional, que sempre me deram força, apoiaram e participaram de mais essa etapa da minha vida. Obrigada por acreditarem em mim, sem vocês nada disso teria sido possível. Eu amo muito vocês.

Ao meu irmão, Igor, que me acompanhou durante essa jornada, me agüentou nos momentos de estresse, sendo uma ótima companhia.

Ao meu namorado e melhor amigo, Luiz Américo pela amizade, carinho, incentivo, compreensão, pelos momentos de atenção e descontração, e por me alegrar em momentos ruins.

Aos amigos do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, pela amizade, e por tornarem o dia-a-dia mais alegre e descontraído. As minhas queridas amigas Mary, Gra, Jaque, e TÁCILA pela amizade e por sempre estarem dispostas a ajudar. A Paty que sempre me ajudou muito, e que mesmo longe considero uma grande amiga, e que com certeza fará muita falta. A Olimpia, por sua dedicação, disposição e por sempre ter um tempo para “quebrar o galho” dos alunos.

À todos que acreditaram e torceram por mim.

À Universidade de São Paulo e aos docentes e funcionários da FFCLRP-USP.

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

Resumo

Davanzo, N.N. **Desenvolvimento de nanopartículas protéicas polimerizadas para veiculação de fotoativos aplicáveis ao tratamento de câncer do sistema nervoso central**. 2016.91f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral em adultos. O tempo de vida do paciente diagnosticado com GBM é, em média, 14 meses, apesar dos tratamentos convencionais, como a radioterapia, neurocirurgia e quimioterapia. A terapia fotodinâmica (TFD), juntamente com a nanotecnologia, são tratamentos alternativos e promissores para o combate do câncer do sistema nervoso central. Sendo assim, foi desenvolvido e avaliado nanopartículas de soro albumina humano (PAM), para veiculação controlada de fotoativos (AlCIPc e curcumina) aplicáveis no tratamento fotodinâmico do câncer do sistema nervoso central. As nanopartículas de albumina foram preparadas por dois métodos distintos (*crosslinking* químico e térmico), e para avaliar qual formulação apresentou as características desejáveis foram feitas caracterizações físico-químicas como tamanho médio de partícula, índice de polidispersividade, potencial zeta e taxa de associação dos fármacos fotossensibilizadores incorporados. A formulação preparada pelo *crosslinking* químico (PAMQ) exibiu características físico-químicas satisfatórias para os estudos *in vitro*, obtendo tamanho médio de partículas de 250 nm, distribuição homogênea (PDI < 0,3), potencial zeta negativo (-25 mV), e quantidades de ativos incorporados na nanopartícula de albumina foi de aproximadamente 20% para a AlCIPc e 40% para a curcumina. A análise morfológica foi realizada através de microscopia de força atômica (MFA), pela qual se observou o formato esférico, e composição heterogênea das nanopartículas. A formulação apresentou estabilidade com previsão de *shelf life* de aproximadamente 9 meses. A PAMQ apresentou ainda biocompatibilidade *in vitro*, na ausência de ativação fotodinâmica, frente à linhagem celular de glioblastoma humano, pelos ensaios de MTT (atividade mitocondrial *in vitro*). Sob irradiação de luz visível em 675 nm em uma dose máxima de 700 mJ.cm⁻², o efeito fototóxico provocado pela PAMQAlCIPc (3 µM) reduziu a viabilidade celular em 22%, enquanto que sob irradiação de luz visível em 418 nm em uma dose máxima de 2000 mJ.cm⁻², o efeito

fototóxico provocado pela PAMQCurcumina (10 μ M) reduziu a viabilidade celular em 59%. Para potencializar o fotodano da célula de glioblastoma humano com a formulação PAMQAICIPc+Curcumina foi feito ensaio em diferentes tempos de irradiação, sendo que no intervalo de 6 horas, a morte celular foi de 77%, provocando um efeito fototóxico desejável para o tratamento fotodinâmico. Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que as nanopartículas protéicas apresentam grande potencial para veiculação de fármacos fotossensibilizadores para aplicação da TFD com o propósito do tratamento de câncer do sistema nervoso, incentivando estudos posteriores baseados em ensaios fotobiológicos *in vitro* e *in vivo*.

Palavras chave: glioblastoma, terapia fotodinâmica, nanopartículas de albumina, ftalocianina de cloro alumínio (AICIPc), e curcumina.

Abstract

Davanzo, N.N. **Development of polymerized protein nanoparticles for vehiculation of photoactive applicable to cancer treatment of system central nervous.** 2016.91f. Dissertation (Master). Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Glioblastoma multiform (GBM) is the most common and aggressive type of brain tumor in adults. The lifetime of the patient diagnosed with GBM is on average 14 months, despite conventional treatments, such as radiotherapy, neurosurgery, and chemotherapy. Photodynamic therapy (PDT) with nanotechnology is an innovative and promising alternative treatment to combat central nervous system cancer. So, this work proposed to develop albumin nanoparticles (PAM) associated with photosensitizers chloro-aluminiumphthalocyanine (AlClPc) and curcumin for PDT application. Albumin nanoparticles were prepared by two different methods (chemical and thermal *crosslinking*), to evaluate which formulation showed desirable characteristics were performed physicochemical characterizations as mean size, polydispersity index, zeta potential and association rate of photosensitizing drugs incorporated. The formulation prepared by chemical *crosslinking* (PAMQ) exhibited satisfactory physicochemical characteristics for *in vitro* studies, obtaining an average diameter of 250 nm, low distribution (around 0,3), negative zeta potential (about -25 mV) and an active uptake rate around 20% for AlClPc and 40% for curcumin. Morphological analysis was performed using atomic force microscopy (AFM), in which was observed the spherical shape and heterogenic composition of nanoparticles. The formulation shows stability with estimated shelf-life of approximately 9 months. The PAM also demonstrated biocompatibility in the absence of photodynamic activation, using cell lines of human glioblastoma by MTT assays. Under irradiation of visible light of 675 nm the maximum dose of 700 mJ cm⁻², induce phototoxic by PAMQAlClPc (at 3 μM) reduced cell viability to 22%. while under visible light of 418 nm the maximum dose of 2000 mJ cm⁻², showed phototoxic effect caused by PAMQCurcumina (at 10 μM) reduced cell viability to 59%. To potentialize photodamage in human glioblastoma cell with PAMQAlClPc+Curcumin was testing at different times of irradiation, wherein in the range of 6 hours, cell death was 77%, causing a desired phototoxic effect for the photodynamic treatment. Therefore, the results obtained in this study indicate that albumin nanoparticles have great potential to photosensitizing drugs for application of

PDT for the purpose of treatment of cancer of the nervous system, encouraging further studies based in the *in vitro* and *in vivo* photobiologicals assays.

Keywords: Glioblastoma, photodynamic therapy, albumin nanoparticles, aluminum chloride phthalocyanine (AlClPc), and curcumin.

Lista de Figuras

- Figura 1.** Fluxograma representativo das etapas de fotossensibilização e dos mecanismos fotodinâmicos (reações fotodinâmicas do Tipo I e II).....4
- Figura 2.** Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos fotodinâmicos de fotossensibilização molecular. S_0 - Estado fundamental; S_1 - estado singlete excitado; T_1 - estado triplete excitado.....6
- Figura 3.** Estrutura química representativa de alguns fotossensibilizadores: (A) azul de metileno, (B) rosa bengala.....7
- Figura 4.** Estrutura química representativa de uma ftalocianina base livre, sendo M = metal central, R = substituintes axiais.....9
- Figura 5.** Estrutura química representativa ftalocianina de cloro e alumínio (cloro(29H, 31H) ftatocianato de alumínio).....11
- Figura 6 –** Estrutura química da curcumina, (E,E)- 1,7 bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, utilizado como compostos fotossensibilizador.....11
- Figura 7.** Esquema de preparo da nanopartícula de albumina pelo método da desnaturação por calor (*crosslinking* térmico), obtendo a PAMT encapsulada com AlClPc e a PAMT vazia, respectivamente. Fonte: autores.....19
- Figura 8.** Esquema de preparo das nanocapsulas. Fonte: autores.....20
- Figura 9.** Esquema de preparação das nanopartículas de albumina pelo método do *crosslinking* químico, obtendo as formulações de PAMQ: vazia, AlClPc, Curcumina, e AlClPc+Curcumina, da esquerda para a direita. Fonte: autores.....21
- Figura 10.** Sistema de irradiação laser Nd-YAG acoplado do OPO-rainbow da Quantel Laser, utilizado nos estudos de fotoestimulação.....30
- Figura 11.** Sistema de irradiação com laser Nd-YAG acoplado ao sistema OPO *rainbow* para excitação em 670 nm (A) e sistema laser de diodo modelo *Eagle* com fibra-óptica difusa para excitação em 670 nm (B), ambos utilizados nos estudos de fotoestimulação.....31

- Figura 12.** Caracterização das formulações em 0, 30, 60, 90: (1) tamanho médio (\pm DP, colunas), (2) índice de polidispersidade (\pm DP, colunas), e (3) potencial zeta (\pm DP, colunas) das formulações de PAMT, vazia e com AlClPc (A), e PAMQ, vazia e com AlClPc (B), respectivamente.....40
- Figura 13.** Caracterização das formulações em 0, 30, 60, 90, 120 e 150 dias: (A) tamanho médio (\pm DP, colunas), (B) índice de polidispersidade (\pm DP, colunas), e (C) potencial zeta (\pm DP, colunas) das formulações.....42
- Figura 14.** Fotomicrografias bidimensionais e tridimensionais, respectivamente, obtidas das formulações (A) PAMQVazia, (B) PAMQAlClPc, (C) PAMQCurcumina, e (D) PAMQAlClPc+Curcumina por microscopia de força atômica.....45
- Figura 15.** Fotomicrografia bidimensional e perfil topográfico dada pela análise do *software* mostrando medições do diâmetro e altura das nanopartículas: (A) Vazia, (B) AlClPc, (C) Curcumina, e (D) AlClPc+Curcumina.....47
- Figura 16.** Evolução dos perfis de transmissão das formulações (A) PAMVazia, (B)PAMAAlClPc, (C)PAMCurcumina e (D)PAMAAlClPc+Curcumina, centrifugadas a 3000 rpm por 4,4 h, a 25°C. Primeiro registro inferior, último perfis superior direito. A abscissa mostra a posição (nm) e a ordenada à transmissão de luz.....50
- Figura 17.** Integral da Transmissão na dependência de tempo para as formulações PAMVazia, PAMAAlClPc, PAMCurcumina, PAMAAlClPc+Curcumina, usando LUMiSizer1 a 3000 rpm e 4,4 h.....51
- Figura 18.** Espectros de absorção UV-Vis (A) e de fluorescência (B), com excitação em 615 nm e máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente, de soluções de AlClPc em acetonitrila (concentrações: 0,5 a 3,0ug/mL para absorção e 0,05 a 1,0ug/mL para fluorescência).....52
- Figura 19.** Curva padrão de AlClPc em acetonitrila: (A) concentração (0,5 – 3 ug/mL) versus absorbância ($y = 0,3492x + 0,0248$; $r = 0,9999$) e (B) concentração (0,05 – 1,0 ug/mL) versus intensidade de fluorescência ($y = 3.10^6 + 386495$; $r = 0,9965$).....53

- Figura 20.** Espectros de absorção UV-Vis (A) e de fluorescência (B), com excitação em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 539 nm, e aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente, de soluções de curcumina em acetonitrila (concentrações: 0,2 a 5,0ug/mL para absorção e 0,1 a 2,0ug/mL para fluorescência).....54
- Figura 21.** Curva padrão de curcumina em acetonitrila: (A) concentração (0,2 – 5,0 ug/mL) versus absorvância ($y = 0,1753x + 0,0049$; $r = 1$) e (B) concentração (0,1 – 1,0 ug/mL) versus intensidade de fluorescência ($y = 3.10^6 + 29047$; $r = 0,9974$).....54
- Figura 22.** Espectro de varredura da Ftalocianina de Cloro e Alumínio, em acetonitrila, incorporada na PAMT, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis (A) e emissão de fluorescência (B), com excitação em 615 nm, máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm, respectivamente.....55
- Figura 23.** Espectro de varredura da Ftalocianina de Cloro e Alumínio, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis e emissão de fluorescência, com excitação em 615 nm e máximo de emissão de fluorescência em 674 nm, aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente.....56
- Figura 24.** Espectro de varredura da curcumina, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção no UV/Vis e emissão de fluorescência, com excitação em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 539 nm, e aberturas de emissão e excitação ajustadas em 3 e 3 nm, respectivamente.....57
- Figura 25.** Espectro de varredura dos fotossensibilizadores AlClPc e curcumina associados, em acetonitrila, incorporada na PAMQ, por espectrofotômetro de absorção UV/Vis (A) e fluorescência (B), respectivamente. Para a emissão de fluorescência de AlClPc, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 615 nm, máximo de emissão de fluorescência em 674 nm e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm, respectivamente; e para a emissão de fluorescência de curcumina, o comprimento de onda de excitação foi ajustado em 430 nm, máximo de emissão de fluorescência em 538 nm e aberturas de emissão e excitação em 3 e 3 nm.....58
- Figura 26.** Fotografias tiradas com um microscópio de contraste de fase da linhagem celular de glioblastoma humano (U87MG).....61

Figura 27. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com formulações de (A) PAMAICIPc e (B) PAMCurcumina, sem ação de luz, as células foram incubadas nas seguintes concentrações de PAMAICIPc 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 μM e PAMCurcumina 5,0; 10,0; 15,0 e 20,0 μM . Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$63

Figura 28. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com formulações de (A) AICIPc livre e (B) curcumina livre, sem ação de luz, e as células foram incubadas nas seguintes concentrações de AICIPc 0,5; 1,0; 3,0 e 5,0 μM e curcumina 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 μM . Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$63

Figura 29. Ensaio de citotoxicidade celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3 h com as formulações PAMVazia, PAMAICIPc, PAMCurcumina e PAMAICIPc+Curcumina, sem ação de luz, e as células foram incubadas com 3,0 μM de PAMAICIPc, 10,0 μM de PAMCurcumina, 3,0 e 10,0 μM de PAMAICIPc+Curcumina, respectivamente. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$64

Figura 30. Ensaio de internalização celular em linhagem de glioblastoma U87MG incubados durante 3h (A), 6h (B), e 9h (C), com as formulações PAMVazia, PAMAICIPc, PAMCurcumina e PAMAICIPc+Curcumina, sem ação de luz. As células foram incubadas com 3,0 μM de PAMAICIPc, 10,0 μM de PAMCurcumina, 3,0 e 10,0 μM de PAMAICIPc+Curcumina. Foi feita análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett, considerando o nível de significância $p < 0,05$66

Figura 31. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação com as formulações de PAMQAICIPc (C), AICIPc livre (D), PAMQCurcumina (E), e Curcumina livre (F) nas células U87MG e posterior irradiação com diferentes doses para a AICIPc (70, 200, 500, e 700 mJ cm^{-2}), com feixe de excitação em 675 nm, e para a curcumina (500, 1000, 1500, e 2000 mJ cm^{-2}), com feixe de excitação em 418 nm. Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm^{-2}) e um controle do laser (A e B), ou seja, células e irradiação de todas as dosagens. Foi

realizado a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....68

Figura 32. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação de 3 horas com a PAMQAICIPc+Curcumina, nas células U87MG e posterior irradiação dose de energia de 500 mJ cm^{-2} para a AICIPc, com feixe de excitação em 675 nm, e dose de energia de 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina, com feixe de excitação em 418 nm. Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm^{-2}). Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....70

Figura 33. Ensaio de fototoxicidade usando o teste de viabilidade MTT após incubação de 3 horas com a PAMQAICIPc+Curcumina, nas células U87MG e posterior irradiação dose de energia de 500 mJ cm^{-2} para a AICIPc, com feixe de excitação em 675 nm, e dose de energia de 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina, com feixe de excitação em 418 nm. Figura A refere-se aos experimentos controle: (1) PAMQAICIPc+Curcumina com aplicação de luz em 500 mJ cm^{-2} em 675 nm, (2) PAMQAICIPc+Curcumina com aplicação de luz em 2000 mJ cm^{-2} em 418 nm, (3) PAMQAICIPc com aplicação de luz em 2000 mJ cm^{-2} em 418 nm, e (4) PAMQCurcumina com aplicação de luz em 500 mJ cm^{-2} em 675 nm. A figura B refere-se ao experimento com diferentes tempos de irradiação. Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....71

Figura 34. Ensaio de fototoxicidade da PAMQAICIPc (3 μM) em célula U87MG com diferentes doses de irradiação (70, 200, 500, e 700 mJ cm^{-2}), com feixe de excitação em 675 nm, potencia do laser em 20 mW, no laser pulsado Brilliant b com sistema OPO Rainbow (A) e no laser contínuo Eagle 2W-630 nm (B). Neste ensaio usou-se como controle negativo apenas com células (0 mJ.cm^{-2}) e um controle do laser (CT 700 mJ). Foi realizada a análise de variância One-Way ANOVA, seguida do pós-teste de Dunnett ($*p < 0,05$ comparado ao controle de 100%).....74

Figura 35. Imagens da microscopia confocal da célula de glioblastoma humano (U87MG) incubada com os fármacos fotossensibilizadores AICIPc (A), curcumina (B), e a conjugação AICIPc-curcumina (C). A primeira coluna representa o núcleo celular corado com DAPI (azul) e o resultado da emissão de fluorescência do fármaco

fotosensibilizador; a segunda coluna representa o citoesqueleto corado com faloidina (verde) e o resultado da emissão de fluorescência do fármaco fotosensibilizador; e a terceira coluna é o resultado da sobreposição do núcleo, citoesqueleto e fármaco fotosensibilizador. A AICIPc apresenta coloração vermelha, enquanto que a curcumina apresenta coloração amarela. Escala: 10 μ m.....76

Lista de Tabelas

Tabela 1. Ensaios <i>in vitro</i> de fotocitotoxicidade (A e B) da PAMAICIPc+Curcumina no tempo zero, com intervalo de irradiação de 3 horas (I) e de 6 horas (II), alternando a aplicação do laser com feixe de excitação em 675 nm (AICIPc) com dose de luz em 500 mJ cm ⁻² e do laser com feixe de excitação em 418 nm (curcumina) com dose de luz em 2000 mJ cm ⁻²	33
Tabela 2. Resultado da caracterização de diferentes lotes de formulação vazia e contendo o fármaco AICIPc.....	36
Tabela 3. Resultado da caracterização das formulações da PAMQ Vazia e com os fotossensibilizadores AICIPc e curcumina.....	38
Tabela 4. Taxa de separação representada pela inclinação dos estudos de estabilidade.....	51
Tabela 5. Quantificação dos fotossensibilizadores encapsulados nas formulações de PAMT e PAMQ.....	59

Lista de abreviaturas e siglas

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singleto
AICIPc	Ftalocianina de cloro-alumínio
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC®	American Type Culture Collection
CT	Controle
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio Padrão
EMP	Erro médio padrão
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FS	Fármaco fotossensibilizante
GBM	Glioblastoma Multiforme
HSA	Human Serum Albumin
INCA	Instituto Nacional de Câncer
IPd	Índice de polidispersão
LD	Limite de detecção
LQ	Limite de quantificação
MFA	Microscopia de força atômica
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazolio
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAMQ químico	Nanopartícula de albumina obtida pelo <i>crosslinking</i>
PAMQAICIPc	Nanopartícula de albumina contendo ftalocianina de cloro alumínio
PAMQAICIPc+Curcumina	Nanopartícula de albumina contendo ftalocianina de cloro alumínio e curcumina
PAMQCurcumina	Nanopartícula de albumina contendo curcumina
PAMQVazia	Nanopartícula de albumina vazia

PAMT térnico	Nanopartícula de albumina obtida pelo <i>crosslinking</i>
PAMTAICIPc alumínio	Nanopartícula de albumina contendo ftalocianina de cloro
PAMTVazia	Nanopartícula de albumina vazia
PLGA	Copolímero poli-láctico- <i>co</i> -glicólico
S ₀	Estado fundamental
S ₁	Estado singleto excitado
SFB	Soro fetal bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
T ₁	Estado tripleto excitado
TFD	Terapia Fotodinâmica
TMZ	Temozolamida
U87MG	Linhagem de Glioblastoma Humano
UV-Vis	Ultravioleta-visível
v/v	volume/volume
ϵ	Absortividade molar
λ	Comprimento de onda de radiação eletromagnética

SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	xii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Câncer.....	1
1.1.1. Glioblastoma Multiforme.....	2
1.2. Processos Fotodinâmicos.....	3
1.2.1. Agentes Fotossensibilizantes	6
1.2.1.1. Ftalocianinas.....	8
1.2.1.2. Curcumina.....	11
1.3. Nanotecnologia	12
1.3.1. Nanopartículas de Albumina.....	14
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo Geral.....	17
2.2. Objetivos Específicos.....	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	18
3.1. Materiais.....	18
3.2. Desenvolvimento da Nanopartícula de Albumina pelo método do <i>crosslinking</i> térmico (PAMT).....	18
3.3. Desenvolvimento da Nanopartícula de Albumina pelo método do <i>crosslinking</i> químico (PAMQ).....	19
3.4. Caracterização Físico Química das Nanopartículas.....	21
3.4.1. Determinação do tamanho da partícula e potencial zeta.....	21
3.4.2. Quantificação dos fármacos incorporados nas formulações.....	22

3.4.3. Determinação da quantidade de AICIPc e/ou curcumina incorporados nas formulações.....	22
3.4.4. Análise Morfológica por microscopia de força atômica (MFA).....	23
3.5. Estudo de Estabilidade das formulações PAMT e PAMQ.....	24
3.6. Caracterização da estabilidade acelerada das formulações.....	24
3.7. Linearidade de AICIPc e Curcumina.....	25
3.7.1. Limite de Detecção (LD) e Limite de Quantificação (LQ).....	26
3.8. Ensaio <i>in vitro</i> de citotoxicidade e fotocitotoxicidade em cultura celular de linhagem de glioblastoma humano U87MG.....	26
3.8.1. Micrografia de cultura celular.....	27
3.8.2. Ensaio <i>in vitro</i> de compatibilidade biológica (citotoxicidade) dos fármacos AICIPc e curcumina.....	27
3.8.2.1. Ensaio <i>in vitro</i> para determinação do tempo de internalização celular adequado para as formulações contendo AICIPc e/ou Curcumina.....	28
3.8.3. Ensaio <i>in vitro</i> de fotocitotoxicidade dos fármacos AICIPc e curcumina.....	29
3.8.3.1. Ensaio <i>in vitro</i> de fotocitotoxicidade da AICIPc comparando o laser com energia contínua e o laser com energia pulsada.....	30
3.8.3.2. Ensaio <i>in vitro</i> de fototoxicidade em diferentes tempos de irradiação.....	31
3.8.4. Ensaio de viabilidade celular (MTT).....	33
3.9. Microscopia Confocal.....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	36
4.1 - Nanopartícula de Albumina obtida pelo <i>Crosslinking</i> Térmico.....	36
4.2 - Nanopartícula de Albumina obtida pelo <i>Crosslinking</i> Químico.....	37
4.3. Caracterização Físico Química das Nanopartículas.....	39
4.3.1. Estudo de estabilidade das formulações PAMT e PAMQ.....	39
4.3.2. Microscopia de Força Atômica (MFA).....	43

4.4. Estabilidade Acelerada das Formulações.....	47
4.5. Linearidade da Ftalocianina de Cloro Alumínio (AlClPc) e Curcumina.....	51
4.5.1. Limites de Detecção (LD) e de Quantificação (LQ).....	55
4.6. Estudo de espectroscopia de absorção e emissão de fluorescência no UV-Vis e determinação da taxa de associação dos fotossensibilizadores incorporados a nanopartícula de albumina.....	55
4.7. Ensaios <i>in vitro</i> em cultura celular de linhagem de glioblastoma humano U87MG.....	60
4.7.1. Micrografia Celular.....	60
4.7.2. Ensaios <i>in vitro</i> de compatibilidade biológica (citotoxicidade).....	62
4.7.2.1. Ensaios <i>in vitro</i> para determinação do tempo de internalização celular adequado para as formulações contendo AlClPc e/ou Curcumina.....	64
4.7.3. Ensaios <i>in vitro</i> de fototoxicidade.....	67
4.7.3.1. Ensaios <i>in vitro</i> de fototoxicidade em diferentes tempos de irradiação.....	70
4.7.4. Ensaios <i>in vitro</i> de fototoxicidade da AlClPc comparando o laser com energia contínua e o laser com energia pulsada.....	72
4.8. Microscopia Confocal.....	74
5. CONCLUSÃO.....	77
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICA.....	79

1 – INTRODUÇÃO

1.1– Câncer

Câncer é o nome dado a um conjunto de mais de 100 doenças que tem em comum o crescimento desordenado de células que invadem tecidos e órgãos, podendo espalhar-se para outras regiões do corpo, num processo denominado de metástase. Essa neoplasia tem sido uma das principais causas de morte no mundo, e os tratamentos convencionais incluem a cirurgia, quimioterapia, radioterapia, e imunoterapias (HARTWELL e KASTAN, 1994; RUI et al., 2016).

Uma célula normal pode sofrer alterações no seu DNA, ocasionando uma mutação genética. Essas células com o material genético modificado passam a receber instruções erradas alterando suas atividades, como a (i) multiplicação de maneira descontrolada e agressiva, (ii) migração para os tecidos vizinhos formando focos disseminados das metástases, e (iii) perda de função. Deste modo, essas células passam a ser denominadas células cancerígenas, tumorais ou neoplásicas (HARTWELL e KASTAN, 1994; YOU e JONES, 2013).

A incidência de câncer no Brasil vem aumentando a cada ano. O Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que, no ano de 2016, haverá mais de 596 mil casos novos de câncer no país, e segundo a estimativa da Organização Mundial de Saúde (OMS), deve-se esperar 27 milhões de casos de câncer em 2030. No Brasil, o câncer é a segunda causa de morte, e os tipos que mais matam são: (i) pulmão, (ii) mama, (iii) pele, (iv) colo de útero, (v) colo retal, (vi) estômago, (vii) fígado, e (viii) sistema nervoso central (INCA, 2016)

O número de casos de câncer em todo mundo deverá aumentar, segundo dados da Organização Mundial da Saúde (do inglês *World Health Organization*, WHO), em parte devido aos novos hábitos da população dos países em desenvolvimento, como o consumo excessivo de bebidas alcoólicas, tabaco, altos teores de gordura e níveis de colesterol, exposição excessiva a radiação solar, entre outros. Atualmente, 10 milhões de pessoas foram diagnosticados com câncer em todo o mundo, e 6 milhões de pessoas morrerão devido a doença (WHO, 2016; INCA, 2016).

1.1.1 – Glioblastoma Multiforme

O Sistema Nervoso Central (SNC) é constituído por um conjunto de células gliais (astrócitos, oligodendrócitos, microglia, e células ependimárias) que oferecem suporte estrutural e funcional para os neurónios. Glioma ou glioblastoma multiforme (GBM) é um tipo de tumor primário mais comum no SNC, que acomete principalmente os adultos. Os principais sintomas de pacientes com GBM são os sintomas neurológicos como dores de cabeça, perda de memória, alterações de personalidade, epilepsia, e convulsões (FILBIN e STILES, 2015; HOLLAND, 2000; MAHER et al., 2001).

Existem duas teorias que explicam a origem do glioma. A primeira teoria sugere que podem surgir a partir da diferenciação de astrócitos e oligodendrócitos. Já a segunda teoria, e mais aceita, sugere que esses tumores surgem a partir de células progenitoras que sofrem processos de mutações durante seu crescimento. Os gliomas são classificados, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), numa escala de I a IV de acordo com o seu grau de malignidade, onde os tumores de grau I são de baixo grau e menos agressivo, e o de grau IV, como o glioblastoma multiforme, altamente malignos (BECHET et al., 2014; MEIR et al., 2010)

Glioblastoma multiforme (GBM) é o tipo mais comum e agressivo de tumor cerebral em adultos, sendo responsáveis por 3% de todas as mortes por câncer no Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA). São resistentes a agentes quimioterápicos, altamente invasivos, e apresentam rápido crescimento, sendo caracterizados por um crescimento multifocal, o que resulta na incapacidade de ressecção completa do tumor. O tempo de vida do paciente diagnosticado com GBM é, em média, 14 meses, apesar dos tratamentos convencionais, como a radioterapia, neurocirurgia, e quimioterapia. Esses tratamentos são ineficazes em razão da capacidade de células anormais repararem o DNA, e da barreira hematoencefálica dificultar o aporte de fármacos ao sistema nervoso central (ALIFIERIS e TRAFALIS, 2015; HOLLAND, 2000; LOPES, CASTILHO-FERNANDES e TEDESCO, 2012; MAHER et al., 2001; STYLLI et al., 1995; TRAN e ROSENTHAL, 2010) (INCA, 2016).

A barreira hematoencefálica (BHE) tem como função fornecer nutrientes e oxigênio ao cérebro, assim como protegê-lo de compostos químicos e neurotóxicos presentes no sangue. Desse modo, a BHE é uma barreira protetora que garante o funcionamento do sistema nervoso central (TELLINGEN et al., 2015).

O principal agente quimioterápico utilizado no tratamento de pacientes diagnosticados com GBM é a temozolamida (TMZ), que consiste em um derivado do agente alquilante dacarbazina. A TMZ é muito eficaz em alguns tratamentos de câncer, como o melanoma, porém, o glioblastoma é resistente a este fármaco. Estudos mostram que a resistência ao fármaco está associada ao fato de enzimas repararem o DNA das células tumorais (CHENG et al., 2011; LEE, 2016).

Deste modo, vem sendo estudados novos tratamentos que visam desenvolver fármacos mais seletivos e específicos para os tecidos com tumores desta natureza, e que são capazes de atravessar a barreira hematoencefálica. A terapia fotodinâmica (TFD), juntamente com a nanotecnologia, são tratamentos alternativos, não invasivos e promissores para o combate do câncer do sistema nervoso central (ALEXIS et al., 2008; BECHET et al., 2008; STYLLI et al., 1995; TRAN e ROSENTHAL, 2010).

1.2 – Processos Fotodinâmicos

Estudos relacionados à utilização de luz visível ou no infra-vermelho próximo com o propósito de tratamento de doenças como raquitismo, vitiligo e câncer de pele foram utilizados há mais de 3 mil anos, pelos egípcios. No entanto, foi apenas no século XIX que a técnica foi melhor estudada e desenvolvida como um tratamento alternativo de tumores, para diagnósticos, na erradicação de microrganismos, entre outras aplicações. Hoje em dia, tem sido muito utilizada como uma forma alternativa para o tratamento coadjuvante de alguns tipos específicos de câncer (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003; LONGO et al., 2012; RIBEIRO et al., 2015).

A Terapia Fotodinâmica consiste na combinação de um fármaco fotossensibilizador (FS) e luz visível, que, na presença de oxigênio molecular pode produzir agentes citotóxicos extremamente reativos que podem inativar células tumorais. O fármaco fotossensibilizante é introduzido no paciente, por via tópica, sistêmica ou parenteral, e se acumula preferencialmente em células que se reproduzem rapidamente. A partir dos mecanismos fotodinâmicos (Figura 1), as moléculas de FS absorvem a luz, de comprimento de onda correspondente ao seu máximo de absorção, e transferem parte da energia absorvida para produção de espécies radicalares via

foto-oxidação de oxigênio molecular para produção de oxigênio singleto (denominado reações fotodinâmicas do Tipo II) ou indução de espécies radicalares oxidativas como ânion superóxido, peróxido, entre outros (denominado reações fotodinâmicas do Tipo I) classificados de forma geral como espécies reativas de oxigênio, EROS ou ROS (do inglês, *Reactive Oxygen Species*) (BHATTA , KEYAL e WANG, 2016; CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; MICHELS, 2003; NYMAN e HYNNINEN, 2004; ONISZCZUKA et al., 2016).

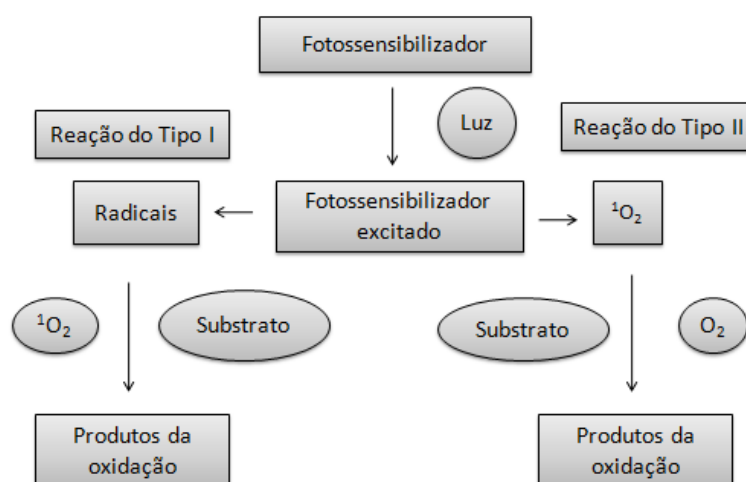


Figura 1. Fluxograma representativo das etapas de fotossensibilização e dos mecanismos fotodinâmicos (reações fotodinâmicas do Tipo I e II).

Fonte: adaptado de DOLMANS, D.E.J.G.J., 2003 (DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003)

No mecanismo de fotossensibilização do tipo I, ocorre transferência energética via transferência de elétrons, do FS no estado triplete excitado, por meio de reações radicalares, para as biomoléculas próximas, resultando em danos oxidativos a esses substratos. Esses radicais por sua vez podem interagir com o oxigênio molecular do meio, formando produtos oxigenados reativos como o peróxido de hidrogênio, superóxidos e radical hidroxil. Já no mecanismo de fotossensibilização do tipo II, ocorre a transferência direta de energia do estado triplete para o oxigênio molecular, resultando na formação do oxigênio singleto (¹O₂), que é uma espécie extremamente eletrofílica, ou seja, muito reativa, resultando em danos oxidativos as espécies biológicas (proteínas, colesterol, fibroblastos, DNA, biomembranas, entre outras), que por fim resultará em

morte celular por necrose ou apoptose (DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003; FARIA et al., 2015; ITRI et al., 2014; ONISZCZUKA et al., 2016).

A TFD pode atuar de diversas maneiras no organismo, podendo agir diretamente sobre as células cancerígenas, ocasionando a morte celular por necrose e/ou apoptose; ou pela interrupção de fornecimento de oxigênio ao tumor, devido o consumo do mesmo durante a formação de espécies reativas de oxigênio. A morte celular por necrose é geralmente descrita como um dano bruto a alguma estrutura celular, ocasionando o rompimento da membrana celular entre outros efeitos em organelas citoplasmáticas. Já a apoptose é a morte celular programada, onde a célula sofre diversas reações em cadeia, se fragmentando e sofrendo o processo de fagocitose. Os tratamentos realizados com base na TFD podem levar a uma maior seletividade na destruição dos tecidos afetados, uma vez que somente as células expostas ao fármaco fotossensibilizador e a luz, de comprimento de onda específico, simultaneamente, na presença de oxigênio, conseguem induzir a formação dos agentes citotóxicos necessários ao processo. Desta forma, a TFD permite a erradicação somente do tecido tumoral desejado (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; HEINRICH et al., 2013; LUNARDI e TEDESCO, 2005; PRIMO et al., 2007; TARDIVO et al., 2005).

Um fármaco fotossensibilizante no seu estado fundamental, se encontra com os elétrons emparelhados, com *spins* contrários. Pela absorção de luz monocromática na forma de fótons o mesmo é induzido às transições eletrônicas moleculares entre o estado fundamental (S_0) e um estado de maior nível energético, o estado singlete excitado (S_1), sem mudança de *spin*. Após a excitação, ocorre o decaimento da energia, por processos de relaxação física conhecidos como conversão interna de calor ou através da emissão de fótons por fluorescência. Ou ainda, este fármaco fotossensibilizante no estado singlete excitado pode sofrer cruzamento inter-sistemas, quando tem energia suficiente para inverter o *spin*, ficando com elétrons desemparelhados, e deste modo, formando o estado excitado tripleto (T_1). Este estado excitado tem tempo de vida mais longo, na escala de microssegundos, e quando volta ao estado fundamental emite luz por fosforescência. A ação fotodinâmica do fármaco fotossensibilizador é dependente da formação do estado excitado tripleto, pois o mesmo é responsável pela formação dos dois tipos de mecanismos fotoquímicos descritos anteriormente (reação do tipo I ou reação do tipo II). Todas essas transições podem ser descritas por meio do diagrama de Jablonski, apresentado na figura 2 (CAMERIN et al.,

2010; DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003; HEINRICH et al., 2013; ITRI et al., 2014; KUDINOVA e BEREZOV, 2008; ONISZCZUKA et al., 2016; SHARMAN , ALLEN e VAN LIER, 1999).

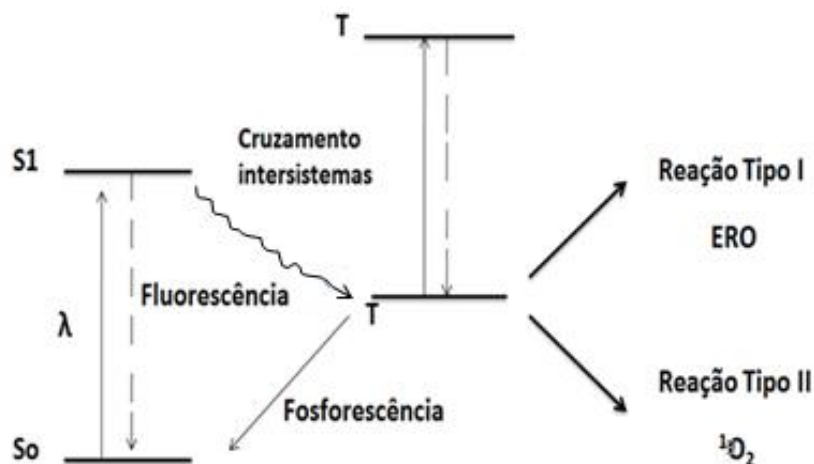


Figura 2. Diagrama de Jablonski simplificado, ilustrando as transições eletrônicas que dão origem aos mecanismos fotodinâmicos de fotossensibilização molecular. S₀ - Estado fundamental; S₁- estado singlete excitado; T₁- estado triplete excitado.

Fonte: adaptado de Konan, Y.N., 2002 (KONAN , GURNY e ALLEMANN, 2002)

Os fatores que afetam a extensão do dano fotodinâmico para a célula e a eficácia da terapia fotodinâmica podem ser descritos a partir da investigação de propriedades fotofísicas e fotoquímicas como: (i) tipo de FS, (ii) localização intra e extracelular, (iii) quantidade de FS administrada, (iv) disponibilidade de oxigênio, e (v) duração da exposição à luz. As limitações da TFD podem estar relacionadas com as propriedades ópticas do tecido, pois estas influenciam a penetração da luz, e a intensidade de luz utilizada para a penetração no tecido (DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004; JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016).

1.2.1 - Agentes Fotossensibilizadores

Os FS são moléculas cromóforas capazes de absorver luz de determinada faixa de comprimento de onda (300 nm a 800 nm) produzindo agentes citotóxicos letais para o tecido doente. Existem muitos tipos de FS capazes de realizar essa função, alguns

exemplos são: porfirinas (Photofrin®), hematoporfirina, ftalocianinas e seus derivados, curcuminóides e seus derivados, clorinas, azul de metileno, rosa bengala, entre outros (figura 3) (ALLISON e SIBATA, 2010; MARANHO et al., 2009; SHARMAN , ALLEN e VAN LIER, 1999; SPAGNUL , TURNER e BOYLE, 2015).

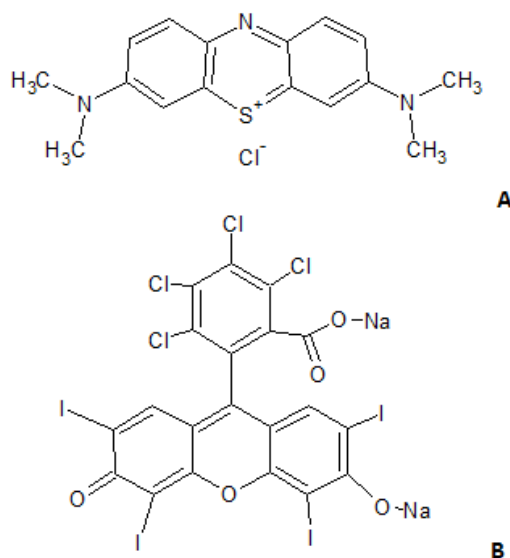


Figura 3. Estrutura química representativa de alguns fotossensibilizadores: (A) azul de metileno e (B) rosa bengala.

Fonte: autores.

A primeira classe de fármacos fotossensibilizadores utilizados para o tratamento fotodinâmico foram os derivados de hematoporfirina, sendo que o primeiro a ser aprovado pelo FDA (Food and Drug Administration) para a comercialização foi o Photofrin® (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; DABROWSKI et al., 2016; DOLMANS , FUKUMURA e JAIN, 2003). Os ensaios clínicos realizados com Photofrin® nos Estados Unidos, França, Holanda e Japão, mostraram bons resultados como sensibilizadores no tratamento fotodinâmico de diversos tipos de câncer, como do esôfago e de pulmão. Porém, essa primeira geração de fotossensibilizadores apresentaram índices significantes de toxicidade, e baixa seletividade com respeito a incorporação por células tumorais, e deste modo, as limitações do uso deste fármaco levou ao desenvolvimento de novos fotossensibilizantes para este propósito, que são chamados de fotossensibilizadores de segunda e terceira geração (ALLISON et al., 2008; CALORI e TEDESCO, 2016; DOUGHERTY e MARCUS, 1992; SHARMAN , ALLEN e VAN LIER, 1999; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003)

A segunda geração de fotossensibilizadores (derivados de ftalocianinas, derivados de curcuminoides, clorinas, azul de metileno, entre outros) absorvem em comprimentos de onda maiores, com elevada absorvidade molar na região do vermelho (600-800nm), resultando em uma resposta fototerapêutica mais eficiente. Já a terceira geração de fotossensibilizadores são desenvolvidos para terem especificidade pelo tecido biológico de interesse (CASTANO , MROZ e HAMBLIN, 2006; DOUGHERTY, 2002; SENGE, 2012).

Para muitos cientistas, o elemento mais importante para a TFD está associado à escolha do tipo do fármaco fotossensibilizador (DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004). Este deve apresentar os seguintes requisitos para que seja considerado ideal a sua utilização na TFD: (i) ser quimicamente puro e de composição conhecida, (ii) apresentar toxicidade mínima no escuro, (iii) ser facilmente retido pelo tecido doente, (iv) ser rapidamente excretado do corpo, considerando sua vida média entre a aplicação do mesmo, sua ativação e eliminação (v) ter alta penetração no tecido, (vi) alta produção de espécies reativas de oxigênio, (vii) ter alta absorção no comprimento de onda de ativação, traduzido respectivamente por um elevado coeficiente de absorvidade, e (viii) ter propriedades hidrofóbicas e hidrofílicas equilibradas (CALORI e TEDESCO, 2016; DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004; LUNARDI e TEDESCO, 2005; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003).

1.2.1.1 – Ftalocianinas

A ftalocianina é um FS que foi desenvolvida, primeiramente, para ser utilizada como pigmento de baixo custo para recobrimento de mídias digitais, e agora tem sido estudada como uma classe de molécula altamente interessante na terapia fotodinâmica para o tratamento do câncer (CLAESSENS , HAHN e TORRES, 2008; LUNARDI e TEDESCO, 2005; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003). A ftalocianina tem origem grega, onde o termo “ftalo” significa óleo de pedra, e “cianina” significa azul escuro. Essa molécula consiste em estruturas aromáticas bidimensionais de 18 elétrons do tipo π , com 4 subunidades ligadas por átomos de nitrogênio. Essa estrutura pode ser relacionada com a porfirina, pois apresenta um metal central e vários ligantes axiais, que permitem substituições. Compostos de ftalocianina tem diversas aplicações na indústria biotecnológica e farmacêutica devido as suas propriedades fotoquímicas,

fotofísicas e fotobiológicas (Figura 4) (ANDERSON et al., 1997; BERLANDA et al., 2010; CALORI e TEDESCO, 2016; TEDESCO , PRIMO e BELTRAME, 2016).

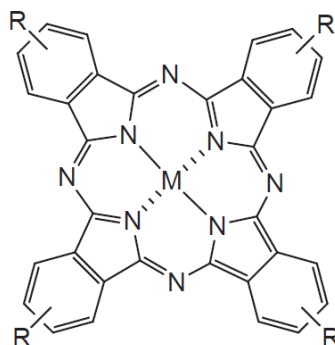


Figura 4. Estrutura química representativa de uma ftalocianina base livre, sendo M = metal central, R = substituintes axiais.

Fonte: Sigma-Aldrich

Compostos ftalocianínicos (do inglês, *phthalocyanines* ou, *PCs*) absorvem fortemente ao redor de 675 nm e possuem um valor de coeficiente de absorvidade molar (ϵ) maior que $100.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Ftalocianinas e seus derivados apresentam uma série de vantagens frente aos derivados de hematoporfirina, pois são relativamente fáceis de sintetizar, de elevada pureza, resistentes a degradação química e fotoquímica, geradoras de oxigênio singleto, e absorvem dentro da Janela Terapêutica (600-800nm), ou seja, a faixa de comprimento de onda na qual a penetração da luz no tecido é maior sem interferência de cromóforos endógenos do sistema biológico (DAZIANO et al., 1998; DETTY , GIBSON e WAGNER, 2004; DE PAULA et al., 2015b; FRANCHI et al., 2016; GAO et al., 2001; NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004)

A ftalocianina é um composto essencialmente hidrofóbico, mas a solubilidade pode ser ajustada substituindo grupos funcionais nas cadeias laterais da molécula, ou fazendo pequenas alterações nos substituintes periféricos da molécula (RODRIGUES et al., 2012; SESALAN , KOCA e GUL, 2008; TEDESCO , ROTTA e LUNARDI, 2003). A insolubilidade em água afeta a biodisponibilidade e distribuição do fármaco fotossensibilizador. Derivados de ftalocianina também são pouco solúveis em solventes orgânicos comuns, resultando em uma desvantagem para sua utilização na terapia

fotodinâmica, o que é estrategicamente solucionado empregando-se nanotecnologia farmacêutica (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016; SAKAMOTO et al., 2004)

Mais de 60 tipos de átomos metálicos ou não metálicos podem ser incorporados na estrutura cíclica dos ftalocianínicos. A substituição de grupos volumosos apolares, como grupo alquila, pode alterar sua solubilidade em meio orgânico, e substituintes aniônicos ou catiônicos, como grupos carboxi, sulfato, e fosfato, resultam em produtos solúveis em meio aquoso. As propriedades fotofísicas das ftalocianinas são fortemente influenciadas pela presença e natureza do íon metálico central, refletindo nas variações no rendimento quântico do estado excitado tripleto e no tempo de vida desse estado excitado. A formação de complexo com íons paramagnéticos como Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} , Ni^{2+} , V^{2+} , Cr^{3+} , Pd^{2+} resultam em um estado tripleto mais curto, enquanto que a formação de complexos com íons diamagnéticos como Zn^{2+} , Al^{3+} , Ga^{3+} aumentam o tempo de vida e o rendimento quântico do estado tripleto (ALLEN , SHARMAN e VAN LIER, 2001; SESALAN , KOCA e GUL, 2008; TEDESCO , PRIMO e BELTRAME, 2016).

Estudos utilizando a ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc) mostraram que esse fármaco mantém todas as suas propriedades fotofísicas e fotoquímicas quando administrado com um nanocarreador. A ftalocianina de cloro alumínio (Figura 5) é um fármaco fotossensibilizador muito hidrofóbico que gera agregados em soluções aquosas, ocasionando a diminuição da sua atividade fotodinâmica. Como estratégia para impedir a agregação e manter todas as propriedades fotoquímicas e fotofísicas, esse fotossensibilizador deve ser administrado com um nanocarreador, utilizando a nanotecnologia. A associação deste com proteínas do soro, como a albumina, também é uma estratégia para a sua absorção preferencial nos tecidos tumorais (JAYME , CALORI e TEDESCO, 2016; MORAIS et al., 2015; NUNES , SGUILLA e TEDESCO, 2004; TEDESCO , PRIMO e BELTRAME, 2016).

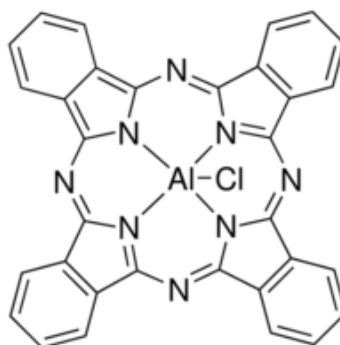


Figura 5. Estrutura química representativa ftalocianina de cloro e alumínio (cloro(29H, 31H) ftatocianato de alumínio).

Fonte: Sigma-Aldrich

1.2.1.2 – Curcumina

Outra classe química de fármaco fotossensibilizador que começa a ser utilizada na TFD é a cúrcuma e os derivados de curcuminóides. A curcumina (Figura 6) é um polifenol hidrofóbico amarelo alaranjado, extraído da raiz de *Curcuma longa L.* Essa molécula é amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa, devido as suas propriedades potenciais quimioterápicas, anti-inflamatórias e antioxidantes, e hoje em dia seu uso é aprovado pela FDA. Algumas dessas ações farmacológicas são intensificadas quando se irradia a curcumina, e deste modo, este fármaco apresenta grande potencial para ser utilizado como agente fotossensibilizador (KOON et al., 2006; MAHESHWARI et al., 2005; PASCHOAL et al., 2013; RUBY et al., 1995).

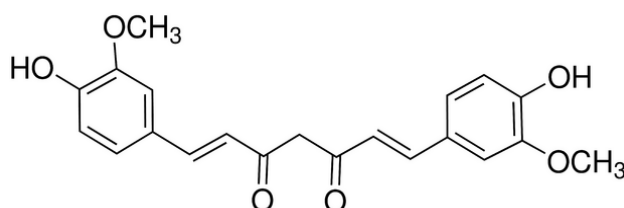


Figura 6 – Estrutura química da curcumina, (E,E)- 1,7 bis (4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, utilizado como compostos fotossensibilizador.

Fonte: Sigma-Aldrich

Esse fármaco fotossensibilizador possui atividades biológicas desejadas para aplicação na terapia fotodinâmica, pois absorvem preferencialmente na faixa de

400-430 nm (SHEN , JI e ZHANG, 2005). De fato, diversas pesquisas revelaram que a curcumina e seus derivados contribuem para a inibição da formação e do crescimento tumoral pelo método da terapia fotodinâmica (DUVOIX et al., 2005; HARIHARAN et al., 2012). Estudos mostraram que o mesmo tem um efeito quimio-preventivo em câncer de cólon, estômago, esôfago e bucal (HATCHER et al., 2008; MAHESHWARI et al., 2005). Além disso, curcuminóides e seus derivados apresentam grande potencial contra doenças crônicas, cardiovasculares, doenças de pele, neurológicas e inflamatórias (DEROSA et al., 2016; PRIYADARSINI, 2009)

Porém estas aplicações da curcumina são limitadas pela sua natureza hidrofóbica, o que dificulta a sua utilização no meio biológico. Curcuminóides são insolúveis em água em pH 7, porém são solúveis em muitos solventes orgânicos, como o metanol, clorofórmio, acetonitrila, etanol, entre outros. Deste modo, devido a sua baixa solubilidade em solução aquosa, esse fármaco é encapsulado em nanopartículas para serem entregues na célula alvo. Portanto, a utilização da nanotecnologia pode aumentar a biodistribuição e biodisponibilidade da curcumina no meio biológico (CORADINI et al., 2015; PRIYADARSINI, 2009; WIKENE et al., 2014).

1.3 – Nanotecnologia: Sistemas de Liberação de Fármacos

O maior objetivo da indústria farmacêutica é de desenvolver agentes terapêuticos que maximizam o efeito do fármaco direcionando-o seletivamente para áreas específicas do corpo. Ao mesmo tempo existem muitos compostos promissores, mas que apresentam propriedades físico-químicas indesejáveis, como a baixa solubilidade e biodistribuição, e, portanto, a melhor maneira de se obter boas propriedades físico-químicas e uma farmacocinética e farmacodinâmica apropriadas é de criar uma maneira de associar o fármaco desejado à um sistema de veiculação. Deste modo, a nanotecnologia vem crescendo e se tornando uma grande influência tanto na área acadêmica quanto na indústria (BERTRAND et al., 2014; KINGSLEY et al., 2006; LOPEZ-LOURENTE e VALCARCEL, 2016).

A utilização da nanotecnologia no desenvolvimento e na descoberta de novos sistemas de veiculação de fármacos é apenas uma de muitas áreas que a mesma pode atuar, podendo ser utilizada também para a liberação controlada de fármacos, diagnósticos *in vitro*, técnicas de terapia gênica, e engenharia de tecidos

(CARUTHERS, WICKLINE e LANZA, 2007; JAIN, 2005; SAHOO , DIINAWAZ e KRISHNAKUMAR, 2008; SHI et al., 2010; ZHANG e WEBSTER, 2009). No entanto, a maioria das pesquisas neste campo estão voltadas para aplicação em oncologia, buscando a utilização de nanocarreadores com especificidade e seletividade por alvos tumorais (BERTRAND et al., 2014; MEI et al., 2013).

O primeiro sistema de liberação de fármacos descrito na literatura na década de 60 foram os sistemas lipossomais, os quais consistem em vesículas formadas por bicamadas fosfolipídicas, as quais possuem biocompatibilidade e capacidade de alterar a especificidade e toxicidade de fármacos {Egbaria, 1990 62 /id;Mezei, 1980 63 /id; Zorzi, 2015 186 /id}. Os lipossomas permitem solubilizar fármacos hidrofóbicos em água, mantendo suas características físico-químicas (HOEBEKE, 1995). Porém, com o surgimento da nanotecnologia, foram desenvolvidos vários tipos de sistemas poliméricos, os quais possuem propriedades diferenciadas e de melhor desempenho terapêutico comparados ao lipossoma. Algumas dessas vantagens são: (i) aumento da atividade terapêutica, (ii) maior solubilidade de fármacos hidrofóbicos, (iii) liberação controlada de fármacos de forma contínua e seletiva, e (iv) proteção química do fármaco contra a degradação (MEI et al., 2013; SAHOO , DIINAWAZ e KRISHNAKUMAR, 2008; SHI et al., 2010; ZORZI et al., 2015).

As nanopartículas se acumulam preferencialmente em células cancerígenas devido ao efeito de permeabilidade e retenção (do inglês, *enhanced permeability and retention effect*, ou EPR), e o diâmetro médio desses nanocarreadores deve ser otimizado dependendo da célula alvo. Esse efeito pode ser devido a deficiência da drenagem linfática da célula, pois os vasos sanguíneos nos tecidos com tumores são irregulares, dilatados e gotejantes, enquanto que os vasos sanguíneos de células normais são compactos. Outro fator relevante é o metabolismo acelerado das células com tumores, pois células cancerígenas apresentam rápido crescimento, fazendo com que essa célula crie ambiente favorável para captar as nanopartículas presentes da corrente sanguínea (LEE et al., 2015; MAEDA, 2001).

Atualmente existem vários tipos de nanocarreadores, os quais se destacam as nanopartículas poliméricas (PATEL et al., 2012), nanopartículas lipídicas sólidas (EKAMBARAM , SHATALI e PRIYANKA, 2011), as nanopartículas magnéticas funcionalizadas (ITO et al., 2005), os nanotubos de carbono (ELHISSI et al., 2011), as nanoemulsões e nanocápsulas poliméricas (CALVO , VILAJATO e ALONSO, 1996;

MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2009), entre outros (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; FAROKHZAD e LANGER, 2009; LANGER et al., 2008; MORA-HUERTAS , FESSI e ELAISSARI, 2009; SEBAK et al., 2010; YIH e AL-FANDI, 2006).

Os sistemas nanoparticulados protéicos são capazes de suportar o *stress* fisiológico, podendo ser administrados via oral ou tópica. Estes sistemas podem ser obtidos a partir de biomoléculas como proteínas, gelatina, colágeno, caseína, e principalmente a albumina, o que confere à esta classe de nanocarreador alta biocompatibilidade, além de maior biodisponibilidade, e de serem facilmente absorvidos pelo organismo (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; KINGSLEY et al., 2006; YU et al., 2015).

1.3.1 – Nanopartículas de Albumina

Nanopartículas de albumina utilizadas como sistema de liberação de fármacos ativos foram introduzidas há mais de 30 anos e vem sendo empregadas em protocolos terapêuticos nas áreas de oftalmologia, neurologia, ortopedia, odontologia e oncologia (KUFLEITNER et al., 2010). Em razão do conhecimento da estrutura primária da proteína, estas nanopartículas oferecem várias possibilidades para a modificação de sua superfície, permitindo tanto adsorção química, quanto ligação covalente com o princípio ativo das mesmas, e deste modo, representam um sistema de veiculação atraente (BATTOGTOKH , KANG e KO, 2015; WEBER et al., 2000; KUFLEITNER et al., 2010)

A albumina do soro humano é um dos materiais mais promissores para preparação de sistemas de nanopartículas, pois estas são toleradas pelo corpo humano sem nenhum efeito colateral. A albumina pode ser obtida em quantidades significantes na clara do ovo, no soro bovino e no soro humano (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; KUFLEITNER et al., 2010).

O soro albumina humano (do inglês, *Human Serum Albumin* ou, *HSA*) é uma proteína globular constituída de aproximadamente 585 resíduos de aminoácidos, de peso molecular de 65 kDa. Sua concentração no sangue é de aproximadamente 50 mg/mL, representando a maior parte da proteína presente no plasma. Essa proteína é capaz de permear o sistema nervoso central, e até mesmo atravessar a barreira

hematoencefálica, capacidade que confere a este tipo de nanomaterial, grande potencial de utilização em métodos terapêuticos neurológicos (BATTOGTOKH , KANG e KO, 2015; FANALI et al., 2012; KUFLEITNER et al., 2010; LANGER et al., 2008; PERALTA et al., 2013).

As partículas de albumina do soro humano têm sido utilizadas em estudos promissores devido a sua capacidade de acumular-se em tecidos com tumor, devido ao efeito de retenção e permeabilidade (EPR), de serem biodegradáveis, de fácil purificação, reprodutíveis e hidrossolúveis. Os tecidos tumorais possuem alta taxa de vascularização, o que confere a propriedade de maior interação com albumina presente no plasma sanguíneo, favorecendo ainda mais a utilização de sistemas proteicos em tratamento oncológico. Além da utilização no tratamento oncológico, as nanopartículas de HSA podem também ser utilizadas em procedimentos terapêuticos de artrite reumatóide, isquemia, entre outras patologias (BATTOGTOKH , KANG e KO, 2015; ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; FANALI et al., 2012; LEE et al., 2015; PERALTA et al., 2013)

Existe uma grande variedade de estratégias de incorporação de fármacos que podem ser aplicadas durante o preparo deste tipo de nanopartícula. Entre elas, pode-se citar: (i) incorporação no interior da matriz polimérica durante a preparação, (ii) ligação covalente superficial e (iii) adsorção direta na superfície pré-formada (KUFLEITNER et al., 2010).

Basicamente, existem dois métodos que são mais utilizados para a preparação de nanopartículas a partir de albumina: (i) formação de emulsão e (ii) dessolvatação (LANGER et al., 2003; YANA et al., 2015).

No processo de emulsificação, as nanopartículas são formadas pela homogeneização da fase oleosa contendo a albumina em alta velocidade, seguida de aquecimento, para conseqüente estabilização da nanopartícula. A emulsão é resfriada e diluída em éter para diminuir a viscosidade do óleo a fim de facilitar a separação de fases por centrifugação (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; YANA et al., 2015).

No método da dessolvatação as nanopartículas são obtidas pela adição contínua de etanol em uma solução aquosa de albumina sob agitação constante, em temperatura ambiente. Durante a adição de etanol ocorre a desnaturação da proteína, formando nanopartículas de albumina. Para a estabilização dessas nanopartículas é adicionado um

agente de *crosslinking*, que irá promover ligações cruzadas entre as moléculas de albumina (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; LANGER et al., 2003; YEDOMON , FESSI e CHARCOSSET, 2013; YANA et al., 2015).

5 - Conclusão

Com base nos resultados apresentados, foi possível concluir que as formulações de PAMQ, obtidas pelo *crosslinking* químico, podem ser reproduzidas com tamanho médio desejável (200 – 500nm), distribuição de tamanho homogêneo (IPd <0,5) e carga residual predominantemente negativa. As mesmas se mostraram estáveis ao longo de 9 meses, como foi comprovado pela estabilidade acelerada utilizando a centrífuga analítica LUMiSizer, pois nesse período a formulação não apresentou tendência a instabilidade físico-química, indicando que não houve formação de aglomerados, sedimentação, precipitação, ou separação de fases. Em relação a encapsulação de AICIPc e curcumina, a nanopartícula de albumina apresentou resultados desejáveis, já que a quantidade de fármaco incorporado é satisfatória para estudos *in vitro*. As formulações obtidas através do *crosslinking* térmico não apresentaram características desejáveis para estudos *in vitro*, pois a eficiência de encapsulação é baixa (em torno de 2%), e a nanopartícula mostra uma tendência a instabilidade físico-química após 60 dias. Deste modo, nanopartículas de albumina preparadas pelo *crosslinking* químico é um método promissor para ser utilizado como sistema de veiculação para o tratamento do câncer do sistema nervoso central, pois além de apresentarem características físico químicas desejáveis, a albumina é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, possibilitando melhores resultados (ELZOGHBY , SAMY e ELGINDY, 2012; PERALTA et al., 2013).

Os ensaios *in vitro* de compatibilidade biológica das formulações em cultura celular de glioblastoma humano U87MG comprovaram que a nanopartícula de albumina não ocasionou efeito tóxico significativo para as células, na ausência de estímulo luminoso. Deste modo, foi escolhido as concentrações de 3 µM para AICIPc e 10 µM para curcumina para posteriormente realizar ensaios futuros de fototoxicidade *in vitro*, e avaliar o efeito do fármaco fotossensibilizador para aplicação na TFD para o tratamento de câncer do sistema nervoso central (BECHET et al., 2008; BRANNON-PEPPAS e BLANCHETTE, 2012).

Quando as células de glioblastoma sofreram irradiação de luz visível em uma dose máxima de 700 mJ cm⁻², o efeito fototóxico provocado pela PAMQAICIPc (3 µM) reduziu a viabilidade celular a 22%, enquanto que sob irradiação de luz visível em uma dose máxima de 2000 mJ cm⁻², o efeito fototóxico provocado pela PAMQCurcumina (10 µM) reduziu a viabilidade celular a 59%. Também foi irradiada a nanopartícula com

Conclusão

os fármacos associados, PAMQAICIPc+Curcumina, nas mesmas concentrações, com dose de energia de 500 mJ cm^{-2} para a AICIPc, e 2000 mJ cm^{-2} para a curcumina, provocando morte celular de 40%. Foram feitos ensaios em diferentes tempos de irradiação para potencializar o fotodano da célula de glioblastoma humano com a formulação PAMQAICIPc+Curcumina, e no intervalo de 6 horas, a morte celular foi de 77%, provocando deste modo, um efeito fototóxico desejável para o tratamento fotodinâmico.

A partir das imagens de microscopia confocal foi possível concluir a internalização qualitativa dos fármacos fotossensibilizadores, e observar que tanto a curcumina quanto a AICIPc se localizam na região citoplasmática da célula de glioblastoma humano (DE PAULA et al., 2015a; LI et al., 2014).

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho indicam que as nanopartículas protéicas apresentam grande potencial para veiculação de fármacos fotossensibilizadores para aplicação da TFD com o propósito do tratamento de câncer do sistema nervoso, incentivando estudos posteriores baseados em ensaios fotobiológicos *in vitro* e *in vivo*. A TFD é um método promissor não só para o tratamento de câncer do sistema nervoso, mas para o uso em outros tipos de câncer e patologias.

6- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALEXIS, F.; RHEE, J. W.; RICHIE, J. P.; RADOVIC-MORENO, A. F.; LANGER, R.; FAROKHZAD, O. C. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment, *Urologic Oncology-Seminars and Original Investigations*, v. 26, p. 74-85, 2008.
- ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment, *Pharmacology & Therapeutics*, v. 152, p. 63-82, 2015.
- ALKILANY, A. M.; THOMPSON, L. B.; BOULOS, S. P.; SISCO, P. N.; MURPHY, C. J. Gold nanorods: Their potential for photothermal therapeutics and drug delivery, tempered by the complexity of their biological interactions, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 190-199, 2012.
- ALLEN, C. M.; SHARMAN, W. M.; VAN LIER, J. E. Current status of phthalocyanines in the photodynamic therapy of cancer, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 5, p. 161-169, 2001.
- ALLISON, R. R.; MOTA, H. C.; BAGNATO, V. S.; SIBATA, C. H. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy - State of the art review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 5, p. 19-28, 2008.
- ALLISON, R. R.; SIBATA, C. H. Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, p. 61-75, 2010.
- ANDERSON, C.; HRABOVSKY, S.; MCKINLEY, Y.; TUBESING, K.; TANG, H. P.; DUNBAR, R.; MUKHTAR, H.; ELMETS, C. A. Phthalocyanine photodynamic therapy: Disparate effects of pharmacologic inhibitors on cutaneous photosensitivity and on tumor regression, *Photochemistry and Photobiology*, v. 65, p. 895-901, 1997.
- ANTON, N.; BENOIT, J. P.; SAULNIER, P. Design and production of nanoparticles formulated from nano-emulsion templates - A review, *Journal of Controlled Release*, v. 128, p. 185-199, 2008.
- ASSUNCAO, E.; WILLIAMS, S. Comparison of continuous wave and pulsed wave laser welding effects, *Optics and Lasers in Engineering*, v. 51, p. 674-680, 2013.
- BAALOUSHA, M.; LEAD, J. R. Characterization of natural and manufactured nanoparticles by atomic force microscopy: Effect of analysis mode, environment and sample preparation, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 419, p. 238-247, 2013.
- BARBUGLI, P. A.; SIQUEIRA-MOURA, M. P.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. In Vitro Phototoxicity of Liposomes and Nanocapsules Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Human Melanoma Cell Line, *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, v. 10, p. 569-573, 2010.

- BATTOGTOKH, G.; KANG, J. H.; KO, Y. T. Long-circulating self-assembled cholesteryl albumin nanoparticles enhance tumor accumulation of hydrophobic anticancer drug, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 96, p. 96-105, 2015.
- BECHET, D.; COULEAUD, P.; FROCHOT, C.; VIRIOT, M. L.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. Nanoparticles as vehicles for delivery of photodynamic therapy agents, *Trends in Biotechnology*, v. 26, p. 612-621, 2008.
- BECHET, D.; MORDON, S. R.; GUILLEMIN, F.; BARBERI-HEYOB, M. A. Photodynamic therapy of malignant brain tumours: A complementary approach to conventional therapies, *Cancer Treatments Reviews*, v. 40, p. 229-241, 2014.
- BERETTA, J. R.; ROSSI, W.; NEVES, M. D. M.; ALMEIDA, I. A.; JUNIOR, N. D. V. Pulsed Nd:YAG laser welding of AISI 304 to AISI 420 stainless steels, *Optics and Lasers in Engineering*, v. 45, p. 960-966, 2007.
- BERLANDA, J.; KIESSLICH, T.; ENGELHARDT, V.; KRAMMER, B.; PLAETZER, K. Comparative in vitro study on the characteristics of different photosensitizers employed in PDT, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 100, p. 173-180, 2010.
- BERTRAND, N.; WU, J.; XU, X.; KAMALY, N.; FAROKHZAD, O. C. Cancer nanotechnology: The impact of passive and active targeting in the era of modern cancer biology, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 66, p. 2-25, 2014.
- BHATTA, A. K.; KEYAL, U.; WANG, X. L. Photodynamic therapy for onychomycosis: A systematic review, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 15, p. 228-235, 2016.
- BHAUMIK, S.; ANJUM, R.; RANGARAJ, N.; PARDHASARADHI, B. V. V.; KHAR, A. Curcumin mediated apoptosis in AK-5 tumor cells involves the production of reactive oxygen intermediates, *FEBS Letters*, v. 456, p. 311-314, 1999.
- BISHT, K.; WAGNER, K. H.; BULMER, A. C. Curcumin, resveratrol and flavonoids as anti-inflammatory, cyto- and DNA-protective dietary compounds, *Toxicology*, p. 88-100, 2010.
- BRANNON-PEPPAS, L.; BLANCHETTE, J. O. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 206-212, 2012.
- CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 160, p. 240-247, 2016.
- CALVO, P.; VILAJATO, J. L.; ALONSO, M. J. Comparative in vitro evaluation of several colloidal systems, nanoparticles, nanocapsules, and nanoemulsions, as ocular drug carriers, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 85, p. 530-536, 1996.
- CAMERIN, M.; MAGARAGGIA, M.; SONCIN, M.; JORI, G.; MORENO, M.; CHAMBRIER, I.; COOK, M. J.; RUSSELL, D. A. The in vivo efficacy of

- phthalocyanine-nanoparticle conjugates for the photodynamic therapy of amelanotic melanoma, *European Journal of Cancer*, v. 46, p. 1910-1918, 2010.
- CARUTHERS, S. D.; WICKLINE, S. A.; LANZA, G. M. Nanotechnological applications in medicine, *Current Opinion in Biotechnology*, v. 18, p. 26-30, 2007.
- CASTANO, A. P.; MROZ, P.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy and anti-tumour immunity, *Nature Reviews Cancer*, v. 6, p. 535-545, 2006.
- CHENG, L.; WU, Q.; GURYANOVA, A.; HUANG, Z.; HUANG, Q.; RICH, J. N.; BAO, S. Elevated invasive potential of glioblastoma stem cells, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 406, p. 643-648, 2011.
- CHIU, H. T.; CHANG, C. Y.; PAN, H. W.; CHIANG, T. Y.; KUO, M. T.; WANG, Y. H. Characterization of polyurethane foam as heat seal coating in medical pouch packaging application, *Journal of Polymer Research*, v. 19, 2012.
- CLAESSENS, C. G.; HAHN, U.; TORRES, T. Phthalocyanines: From outstanding electronic properties to emerging applications, *Chemical Record*, v. 8, p. 75-97, 2008.
- CORADINI, K.; FRIEDRICH, R. B.; FONSECA, F. N.; VENCATO, M. S.; ANDRADE, D. F.; OLIVEIRA, C. M.; BATTISTEL, A. P.; GUTERRES, S. S.; DA ROCHA, M. I. U. MU.; POHLMANN, A. R.; BECK, R. C. R. A novel approach to arthritis treatment based on resveratrol and curcumin co-encapsulated in lipid-core nanocapsules: In vivo studies, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 78, p. 163-179, 2015.
- DABROWSKI, J. M.; PUCELIK, B.; REGIEL-FUTYRA, A.; BRINDELL, M.; MAZURYK, O.; KYZIOL, A.; STOCHEL, G.; MACYK, W.; ARNAUT, L. G. Engineering of relevant photodynamic processes through structural modifications of metallotetrapyrrolic photosensitizers, *Coordination Chemistry Reviews*, v. 325, p. 67-101, 2016.
- DAZIANO, J. P.; HUMEAU, L.; HENRY, M.; MANNONI, P.; CHANON, M.; CHABANNON, C.; JULLIARD, M. Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminum phthalocyanine, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 43, p. 128-135, 1998.
- DE PAULA, L. B.; PRIMO, F. L.; PINTO, M. R.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 380, p. 372-376, 2015a.
- DE PAULA, L. B.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. F. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitizers: Photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 49, p. 371-381, 2015b.

- DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid Colorimetric Assay for Cell-Growth and Survival - Modifications to the Tetrazolium Dye Procedure Giving Improved Sensitivity and Reliability, *Journal of Immunological Methods*, v. 89, p. 271-277, 1986.
- DEROSA, G.; MAFFIOLI, P.; SIMENTAL-MENDÍA, L. E.; BO, S.; SAHEBKAR, A. Effect of curcumin on circulating interleukin-6 concentrations: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials, *Pharmacological Research*, v. 111, p. 394-404, 2016.
- DETLOFF, T.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Particle size distribution by space or time dependent extinction profiles obtained by analytical centrifugation (concentrated systems), *Powder Technology*, v. 174, p. 50-55, 2007.
- DETTY, M. R.; GIBSON, S. L.; WAGNER, S. J. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy, *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 47, p. 3897-3915, 2004.
- DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer, *Nature Publishing Group*, v. 3, p. 380-387, 2003.
- DOUGHERTY, T. J. An Update on Photodynamic Therapy Applications, *Journal of Clinical Laser Medicine & Surgery*, v. 20, p. 3-7, 2002.
- DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. T. **Photodynamic Therapy**, *EurJ Cancer*, v. 28A, p. 1734-1742, 1992.
- DUVOIX, A.; BLASIUS, R.; DELHALLE, S.; SCHNEKENBURGER, M.; MORCEAU, F.; HENRY, E.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Chemopreventive and therapeutic effects of curcumin, *Cancer Letters*, v. 223, p. 181-190, 2005.
- EKAMBARAM, P.; SHATALI, A. A. H.; PRIYANKA, K. Solid Lipid Nanoparticles: A review, *Scientific Reviews & Chemical Communications*, v. 2, p. 80-102, 2011.
- ELHISSI, A. M. A.; AHMED, W.; HASSAN, I. U.; DHANAK, V. R.; D'EMANUELE, A. **Carbon Nanotubes in Cancer Therapy and Drug Delivery**, *Journal of Drug Delivery*, v. 2012, 2011.
- ELZOGHBY, A. O.; SAMY, W. M.; ELGINDY, N. A. Albumin-based nanoparticles as potential controlled release drug delivery systems, *Journal of Controlled Release*, v. 157, p. 168-182, 2012.
- ESTEVEZ, J. P.; ASCENCIO, M.; COLIN, P.; FARINE, M. O.; COLLINET, P.; MORDON, S. Continuous or fractionated photodynamic therapy? Comparison of three PDT schemes for ovarian peritoneal micrometastasis treatment in a rat model, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 7, p. 251-257, 2010.
- FANALI, G.; DI MASI, A.; TREZZA, V.; MARINO, M.; FASANO, M.; ASCENZI, P. Human serum albumin: From bench to bedside, *Molecular Aspects of Medicine*, v. 33, p. 209-290, 2012.

- FARIA, P. E. P.; FELIPUCCI, D. N. B.; SIMIONI, A. R.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; SALATA, L. A. Effects of Photodynamic Process (PDP) in Implant Osseointegration: A Histologic and Histometric Study in Dogs, *Clinical Implant Dentistry and Related Research*, v. 17, p. 879-890, 2015.
- FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Impact of Nanotechnology on Drug Delivery, *Acs Nano*, v. 3, p. 16-20, 2009.
- FIEDLER, D. M.; SCHNITZHOFFER, G.; WALT, H.; DOBLER-GIRDZIUNAITE, D.; KRAMMER, B. Photodynamic Cytotoxicity Enhancement by Pulsed Diode Laser Irradiation, *Lasermedicine*, v. 15, p. 107-114, 2000.
- FILBIN, M. G.; STILES, C. D. Of Brains and Blood: Developmental Origins of Glioma Diversity?, *Cancer Cell*, v. 28, p. 403-404, 2015.
- FRANCHI, L. P.; AMANTINO, C. F.; MELO, M. T.; MONTALDI, A. P. L.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C. In vitro effects of photodynamic therapy induced by chloroaluminum phthalocyanine nanoemulsion, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy* 2016.
- GAO, L. D.; QIAN, X. H.; ZHANG, L.; ZHANG, Y. X. Tetra-trifluoroethoxyl zinc phthalocyanine: potential photosensitizer for use in the photodynamic therapy of cancer, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 65, p. 35-38, 2001.
- GIGO-BENATO, D.; GEUNA, S.; ROCHKIND, S. Phototherapy for enhancing peripheral nerve repair: A review of the literature, *Muscle & Nerve*, v. 31, p. 694-701, 2005.
- GOTO, P. L.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; DOS SANTOS, O. D. H. Preparation and Characterization of Polymeric Nanocapsules Produced by in Situ Polymerization From Nanoemulsions Produced by Direct Emulsification, *Journal of Dispersion Science and Technology*, v. 34, p. 228-233, 2013.
- GUINEBRETIERE, S.; BRIANCON, S.; FESSI, H.; TEODORESCU, V. S.; BLANCHIN, M. G. Nanocapsules of biodegradable polymers: preparation and characterization by direct high resolution electron microscopy, *Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems*, v. 21, p. 137-142, 2002.
- HARIHARAN, R.; SENTHILKUMAR, S.; SUGANTHI, A.; RAJARAJAN, M. Photodynamic action of curcumin derived polymer modified ZnO nanocomposites, *Materials Research Bulletin*, v. 47, p. 3090-3099, 2012.
- HARPER, J. D.; LIEBER, C. M.; LANSBURY, P. T. Atomic force microscopic imaging of seeded fibril formation and fibril branching by the Alzheimer's disease amyloid-p protein, *Chemistry & Biology*, v. 4, p. 951-959, 1997.
- HARTWELL, L. H.; KASTAN, M. B. Cell Cycle Control and Cancer, *Science*, v. 266, 1994.

- HATCHER, H.; PLANALP, R.; CHO, J.; TORTIA, F. M.; TORTI, S. V. Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials, *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, p. 1631-1652, 2008.
- HEINRICH, T. A.; TEDESCO, A. C.; FUKUTO, J. M.; DA SILVA, R. S. Production of reactive oxygen and nitrogen species by light irradiation of a nitrosyl phthalocyanineruthenium complex as a strategy for cancer treatment, *Royal Society of Chemistry*, v. 43, p. 4021-4025, 2013.
- HOEBEKE, M. The importance of liposomes as models and tools in the understanding of photosensitization mechanisms, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 28, p. 189-196, 1995.
- HOLLAND, E. C. Glioblastoma multiforme: The terminator, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 97, p. 6242-6244, 2000.
- <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home> (acessado em 20/09/2016)
- ITO, A.; SHINKAI, M.; HONDA, H.; KOBAYASHI, T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 100, p. 1-11, 2005.
- ITRI, R.; JUNQUEIRA, H. C.; MERTINS, O.; BAPTISTA, M. S. Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids, *Biophys Rev*, v. 6, p. 47-61, 2014.
- JAIN, K. K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics, *Clinica Chimica Acta*, v. 358, p. 37-54, 2005.
- JAYME, C. C.; CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Spectroscopic analysis of aluminum chloride phthalocyanine in binary water/ethanol systems for the design of a new drug delivery system for photodynamic therapy cancer treatment, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, v. 153, p. 178-183, 2016.
- KAWAUCHI, S.; MORIMOTO, Y.; SATO, S.; ARAI, T.; SEGUCHI, K.; ASANUMA, H.; KIKUCHI, M. Differences between cytotoxicity in photodynamic therapy using a pulsed laser and a continuous wave laser: study of oxygen consumption and photobleaching, *Lasers in Medical Science*, v. 18, p. 179-183, 2004.
- KINGSLEY, J. D.; DOU, H. Y.; MOREHEAD, J.; RABINOW, B.; GENDELMAN, H. E.; DESTACHE, C. J. Nanotechnology: A Focus on Nanoparticles as a Drug Delivery System, *Journal of Neuroimmune Pharmacology*, v. 1, p. 340-350, 2006.
- KONAN, Y. N.; GURNY, R.; ALLEMANN, E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, v. 66, p. 89-106, 2002.

- KOON, H. K.; LEUNG, A. W. N.; YUE, K. K. M.; MAK, N. K. Photodynamic effect of curcumin on NPC/CNE2 cell, *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*, v. 25, p. 205-215, 2006.
- KUDINOVA, N. V.; BEREZOV, T. T. **Photodynamic Therapy of Cancer: Search For Ideal Photosensitizer**, *Biomeditsinskaya Khimiya*, v. 4, p. 95-103, 2008.
- KUFLEITNER, J.; WAGNER, S.; WOREK, F.; VON BRIESEN, H.; KREUTER, J. Adsorption of obidoxime onto human serum albumin nanoparticles: Drug loading, particle size and drug release, *Journal of Microencapsulation*, v. 27, p. 506-513, 2010.
- LANGER, K.; ANHORN, M. G.; STEINHAUSER, I.; DREIS, S.; CELEBI, D.; SCHRICKEL, I.; FAUST, S.; VOGEL, V. Human serum albumin (HSA) nanoparticles: Reproducibility of preparation process and kinetics of enzymatic degradation, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 347, p. 109-117, 2008.
- LANGER, K.; BALTHASAR, S.; VOGEL, V.; DINAUER, N.; VON BRIESEN, H.; SCHUBERT, D. Optimization of the preparation process for human serum albumin (HSA) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 257, p. 169-180, 2003.
- LEE, M.; YOO, D.; LING, D.; CHO, M. H.; HYEON, T.; CHEON, J. Iron Oxide Based Nanoparticles for Multimodal Imaging and Magnetoresponse Therapy, *Chemical Reviews* 2015.
- LEE, S. Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme, *Genes & Diseases*, v. 3, p. 198-210, 2016.
- LERCHE, D.; SOBISCH, T. Evaluation of particle interactions by in situ visualization of separation behaviour, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 440, p. 122-130, 2014.
- LI, D. H.; LI, L.; LI, P. X.; LI, Y.; CHEN, X. Y. Apoptosis of HeLa cells induced by a new targeting photosensitizer-based PDT via a mitochondrial pathway and ER stress, *Oncotargets and Therapy*, v. 8, p. 703-711, 2015.
- LI, L.; XIANG, D.; SHIGDAR, S.; YANG, W.; LI, Q.; JIA, L.; LIU, K.; DUAN, W. Epithelial cell adhesion molecule aptamer functionalized PLGA-lecithin-curcumin-PEG nanoparticles for targeted drug delivery to human colorectal adenocarcinoma cells, *International Journal of Nanomedicine*, v. 9, p. 1083-1096, 2014.
- LIU, T. Y.; HU, S. H.; LIU, D. M.; CHEN, S. Y.; CHEN, I. W. Biomedical nanoparticle carriers with combined thermal and magnetic responses, *Nano Today*, v. 4, p. 52-65, 2009.
- LONGO, J. P. F.; LEAL, S. C.; SIMIONI, A. R.; ALMEIDA-SANTOS, M. F. M.; TEDESCO, A. C.; AZEVEDO, R. B. Photodynamic therapy disinfection of carious tissue mediated by aluminum-chloride-phthalocyanine entrapped in cationic liposomes: an in vitro and clinical study, *Lasers Med Sci*, v. 27, p. 575-584, 2012.

- LOPES, T. G.; CASTILHO-FERNANDES, A.; TEDESCO, A. C. Ampla caracterização do Glioblastoma e abordagens terapêuticas, *Revista da Universidade Vale do Rio Verde*, v. 10, p. 12-25, 2012.
- LOPEZ-LOURENTE, A. I.; VALCARCEL, M. The third way in analytical nanoscience and nanotechnology: Involvement of nanotools and nanoanalytes in the same analytical process, *Trends in Analytical Chemistry*, v. 75, p. 1-9, 2016.
- LUNARDI, C. N.; TEDESCO, A. C. Synergic photosensitizers: A new trend in photodynamic therapy, *Current Organic Chemistry*, v. 9, p. 813-821, 2005.
- MAEDA, H. The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: the key role of tumor selective macromolecular drug targeting., *Advances in Biological Regulation* p. 207, 2001.
- MAHER, E. A.; FURNARI, F. B.; BACHOO, R. M.; ROWITCH, D. H.; LOUIS, D. M.; CAVENEE, W. K.; DEPINHO, R. A. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter, *Genes & Development*, v. 15, p. 1311-1333, 2001.
- MAHESHWARI, R. K.; SINGH, A. K.; GADDIPATI, J.; SRIMAL, R. C. Multiple biological activities of curcumin: A short review, *Life Sciences*, v. 78, p. 2081-2087, 2005.
- MARANHO, D. S.; DE LIMA, R. G.; PRIMO, F. L.; DA SILVA, R. S.; TEDESCO, A. C. Photoinduced Nitric Oxide and Singlet Oxygen Release from ZnPC Liposome Vehicle Associated with the Nitrosyl Ruthenium Complex: Synergistic Effects in Photodynamic Therapy Application, *Photochemistry and Photobiology*, v. 85, p. 705-713, 2009.
- MARTY, J. J.; OPPENHEIMER, R. C.; SPEISER, P. Nanoparticles - a new colloidal drug delivery system., *Pharmaceutica Acta Helvetia*, v. 53, p. 23, 1978.
- MEI, L.; ZHANG, Z.; ZHAO, L.; HUANG, L.; YANG, X. L.; TANG, J.; FENG, S. S. Pharmaceutical nanotechnology for oral delivery of anticancer drugs, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 65, p. 880-890, 2013.
- MEIR, E. G. V.; HADJIPANAYIS, C. G.; NORDEN, A. D.; SHU, H. K.; WEN, P. Y.; OLSON, J. J. Exciting New Advances in Neuro-Oncology: The Avenue to a Cure for Malignant Glioma, *American Cancer Society*, v. 60, p. 166-193, 2010.
- MICHELS, S. Sequence of early vascular events after photodynamic therapy, *Investigation Ophthalmology Science*, v. 44, p. 2147-2154, 2003.
- MIQUEL, J.; BERND, A.; SEMPERE, J. M.; DIAZ-ALPERI, J.; RAMIREZ, A. The curcuma antioxidants: pharmacological effects and prospects for future clinical use: A review, *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 34, p. 37-46, 2002.
- MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 385, p. 113-142, 2009.

- MORAIS, M.; VASCONCELOS, R. C.; LONGO, J. P. F.; MUEHLMANN, L. A.; AZEVEDO, R. B.; LEMOS, T. M. A. M.; COSTA, A. L. L. Effects of photodynamic therapy mediated by nanoemulsion containing chloro-aluminum phthalocyanine: a histologic and immunohistochemical study in human gingiva, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 12, p. 592-597, 2015.
- MUKERJEE, A.; VISHWANATHA, J. K. **Formulation, Characterization and Evaluation of Curcumin-loaded PLGA Nanospheres for Cancer Therapy**, *Anticancer Research*, v. 29, p. 3867-3876, 2009.
- NAVAEIPOUR, F.; AFSHARAN, H.; TAJALLI, H.; MOLLABSHI, M.; RANJBARI, F.; MONTASERI, A.; RAHIDI, M. R. Effects of continuous wave and fractionated diode laser on human fibroblast cancer and dermal normal cells by zinc phthalocyanine in photodynamic therapy: A comparative study, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 161, p. 456-462, 2016.
- NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. **Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives**, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, p. 273-284, 2004.
- NYMAN, E.; HYNNINEN, P. Research advances in the use of metatrapyrrolic photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry & Photobiology*, v. 73, p. 1-28, 2004.
- OGURA, S.; TABATA, K.; FUKUSHIMA, K.; KAMACHI, T.; OKURA, I. Development of phthalocyanines for photodynamic therapy, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 10, p. 1116-1124, 2006.
- ONISZCZUKA, A.; WOJTUNIK-KULESZAA, K. A.; ONISZCZUKB, T.; KASPRZAKA, K. The potential of photodynamic therapy (PDT)—Experimental investigations and clinical use, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 83, p. 919-929, 2016.
- PASCHOAL, M. A.; TONON, C. C.; SPOLIDORIO, D. M. P.; BAGNATO, V. S.; GIUSTI, J. S. M.; PINTO, L. S. **Photodynamic potential of curcumin and blue LED against *Streptococcus mutans* in aplanktonic culture**, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 10, p. 313-319, 2013.
- PATEL, T.; ZHOU, J. B.; PIEPMEIER, J. M.; SALTZMAN, W. M. Polymeric nanoparticles for drug delivery to the central nervous system, *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 64, p. 701-705, 2012.
- PERALTA, D. V.; HE, J.; WHEELER, D. A.; ZHANG, J. Z.; TARR, M. A. Encapsulating Gold Nanomaterials Into Size-Contolled Human Serum Albumin Microparticles for Photothermal Cancer Therapy Platforms, *Langmuir*, p. 1-19, 2013.
- PEREIRA, M. A.; MOSIQUEIRA, V. C.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; RAMALDES, G. A.; CARDOSO, V. N. PLA-PEG nanocapsules radiolabeled with (99m)Technetium-HMPAO: Release properties and physicochemical characterization by atomic force microscopy and photon correlation

- spectroscopy, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 33, p. 42-51, 2008.
- PETZOLD, G.; GOLTZCHE, C.; MENDE, M.; SCHWARE, S.; JAEGER, W. Monitoring the Stability of Nanosized Silica Dispersions in Presence of Polycations by a Novel Centrifugal Sedimentation Method, *Journal of Applied Polymer Science*, v. 114, p. 696-704, 2009.
- PREETZ, C.; HAUSE, G.; KRAMER, A.; MADER, K. Application of atomic force microscopy and ultrasonic resonator technology on nanoscale: Distinction of nanoemulsions from nanocapsules, *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 39, p. 141-151, 2010.
- PRIMO, F. L.; MACAROFF, P. P.; LACAVA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Binding and photophysical studies of biocompatible magnetic fluid in biological medium and development of magnetic nanoemulsion: A new candidate for cancer treatment, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, v. 310, p. 2838-2840, 2007.
- PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells, *Journal of Photochemistry and Photobiology C-Photochemistry Reviews*, v. 10, p. 81-95, 2009.
- RIBEIRO, A. P. D.; ANDRADE, M. C.; BAGNATO, V. S.; VERGANI, C. E.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; PAVARINA, A. C. Antimicrobial photodynamic therapy against pathogenic bacterial suspensions and biofilms using chloroaluminum phthalocyanine encapsulated in nanoemulsions, *Lasers Med Sci*, v. 30, p. 549-559, 2015.
- RODRIGUES, G. B.; PRIMO, F. L.; TEDESCO, A. C.; BRAGA, G. U. L. In Vitro Photodynamic Inactivation of *Cryptococcus neoformans* Melanized Cells with Chloroaluminum Phthalocyanine Nanoemulsion, *Photochemistry and Photobiology*, v. 88, p. 440-447, 2012.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 263, p. 85-94, 2003a.
- ROLAND, I.; PIEL, G.; DELATTRE, L.; EVRARD, B. Systematic characterization of oil-in-water emulsions for formulation design, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 263, p. 85-94, 2003b.
- RUBY, A. J.; KUTTAN, G.; BABU, K. D.; RAJASEKHARAM, K. N.; KUTTAN, R. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids, *Cancer Letters*, v. 94, p. 79-83, 1995.
- RUI, L. L.; CAO, H. L.; XUE, Y. D.; LIU, C. H.; XU, L.; GAO, Y.; ZHANG, W. A. Functional organic nanoparticles for photodynamic therapy, *Chinese Chemical Letters* 2016.

- SAHOO, S. K.; DIINAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery, *Drug Discovery Today*, v. 13, p. 144-151, 2008.
- SAKAMOTO, K.; KATO, T.; OKUMURA, E. O.; WATANABE, M.; COOK, M. O. Synthesis of novel cationic amphiphilic phthalocyanine derivatives for next generation photosensitizer using photodynamic therapy of cancer, *Dyes and Pigments*, v. 64, p. 63-71, 2004.
- SARKAR, T.; HUSSAIN, A. Photocytotoxicity of Curcumin and its Iron Complexes, *Enzyme Engineering*, v. 5, 2016.
- SEBAK, S.; MIRZAEI, M.; MALHOTRA, M.; KULAMARVA, A.; PRAKASH, S. Human serum albumin nanoparticles as an efficient noscapine drug delivery system for potential use in breast cancer: preparation and in vitro analysis, *International Journal of Nanomedicine*, v. 5, p. 525-532, 2010.
- SELVAM, R.; SUBRAMANIAN, L.; GAYATHRI, R.; ANGAYARKANNI, N. The anti-oxidant activity of turmeric (*Curcuma longa*), *Journal of Ethnopharmacology*, v. 47, p. 59-67, 1995.
- SENIGE, M. O. mTHPC — A drug on its way from second to third generation photosensitizer?, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 9, p. 170-179, 2012.
- SESALAN, B. S.; KOCA, A.; GUL, A. Water soluble novel phthalocyanines containing dodeca-amino groups, *Dyes and Pigments*, v. 79, p. 259-264, 2008.
- SHARMAN, W. M.; ALLEN, C. M.; VAN LIER, J. E. Photodynamic therapeutics: basic principles and clinical applications, *Drug Discovery Today*, v. 4, p. 507-517, 1999.
- SHEN, L.; JI, H. F.; ZHANG, H. Y. A TD-DFT study on triplet excited-state properties of curcumin and its implications in elucidating the photo sensitizing mechanisms of the pigment, *Chemical Physics Letters*, v. 409, p. 300-303, 2005.
- SHI, J. J.; VOTRUBA, A. R.; FAROKHZAD, O. C.; LANGER, R. Nanotechnology in Drug Delivery and Tissue Engineering: From Discovery to Applications, *Nano Letters*, v. 10, p. 3223-3230, 2010.
- <http://www.sigmaaldrich.com/canada-english.html> (acessado 20/09/2016)
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; ESPREAFICO, E. M.; TEDESCO, A. C. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules, *Materials Science & Engineering C-Materials for Biological Applications*, v. 33, p. 1744-1752, 2013.
- SIQUEIRA-MOURA, M. P.; PRIMO, F. L.; PETI, A. P. F.; TEDESCO, A. C. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers, *Pharmazie*, v. 65, p. 9-14, 2010.

- SOBISCH, T.; LERCHE, D. Thickener performance traced by multisample analytical centrifugation, *Colloids and Surfaces A-Physicochemical and Engineering Aspects*, v. 331, p. 114-118, 2008.
- SPAGNUL, C.; TURNER, L. C.; BOYLE, R. W. Immobilized photosensitizers for antimicrobial applications, *Journal of Photobiology & Biology*, v. 150, p. 11-30, 2015.
- STYLLI, S. S.; HILL, J. S.; SAWYER, W. H.; KAYE, A. H. Aluminum Phthalocyanine Mediated Photodynamic Therapy in Experimental Malignant Glioma, *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 2, p. 146-151, 1995.
- TABATA, Y.; IKADA, Y. Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-lactic acid/glycolic acid homo and copolymers, *Journal of Biomedical Materials Research*, v. 22, p. 837-858, 1988.
- TARDIVO, J. P.; GIGLIO, A. D.; OLIVEIRSA, C. S.; GABRIELLI, D. S.; JUNQUEIRA, H. C.; TADA, D. B.; SEVERINO, D.; TURCHIELLO, R. F.; BAPTISTA, M. S. Methylene blue in photodynamic therapy: from basic mechanisms to clinical application, *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, v. 2, p. 175-191, 2005.
- TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; BELTRAME, M. Phthalocyanines: Synthesis, Characterization and Biological Applications of Photodynamic Therapy (PDT), Nanobiotechnology, Magnetohyperthermia and Photodiagnosis (Theranostics), *Materials Science and Materials Engineering* p. 1-6, 2016.
- TEDESCO, A. C.; ROTTA, J. C. G.; LUNARDI, C. N. Synthesis, photophysical and photochemical aspects of phthalocyanines for photodynamic therapy, *Current Organic Chemistry*, v. 7, p. 187-196, 2003.
- TEIXEIRA, M.; ALONSO, M. J.; PINTO, M. M. M.; BARBOSA, C. M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthone and 3-methoxyxanthone, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 59, p. 491-500, 2005.
- TELLINGEN, O.; YETKIN-ARIK, B.; GOOIJER, M. C.; WESSELING, P.; WURDINGER, T.; VRIES, H. E. Overcoming the blood-brain tumor barrier for effective glioblastoma treatment, *Drug Resistance Updates*, v. 19, p. 1-12, 2015.
- TRAN, B.; ROSENTHAL, M. A. Survival comparison between glioblastoma multiforme and other incurable cancers, *Journal of Clinical Neuroscience*, v. 17, p. 417-421, 2010.
- TWENTYMAN, P. R.; LUSCOMBE, M. A Study of Some Variables in A Tetrazolium Dye (Mtt) Based Assay for Cell-Growth and Chemosensitivity, *British Journal of Cancer*, v. 56, p. 279-285, 1987.
- WEBER, C.; COESTER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characterisation of protein nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 194, p. 91-102, 2000.

- WIKENE, K. O.; HEGGE, A. B.; BRUZELL, E.; TONNESEN, H. H. Formulation and characterization of lyophilized curcumin solid dispersions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): studies on Wikencurcumin and curcuminoids LII, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, v. 6, p. 969-977, 2014.
- <http://www.who.int/eportuguese/countries/bra/pt/> (Acessado 16/09/2016)
- XIAO, Z.; HALLS, S.; DICKEY, D.; TULIP, J.; MOORE, R. B. Fractionated versus Standard Continuous Light Delivery in Interstitial Photodynamic Therapy of Dunning Prostate Carcinomas, *Cancer Therapy: Preclinical*, v. 24, p. 7496-7505, 2007.
- XU, R. L. Progress in nanoparticles characterization: Sizing and zeta potential measurement, *Particuology*, v. 6, p. 112-115, 2008.
- YANA, S.; ZHANGA, H.; PIAOA, J.; CHENA, Y.; GAOA, S.; LUA, C.; NIUA, L.; XIAA, Y.; HUA, Y.; JIA, R.; WANGA, H.; XUA, X. Studies on the preparation, characterization and intracellular kinetics of JD27-loaded human serum albumin nanoparticles, *Procedia Engineering*, v. 102, p. 590-601, 2015.
- YEDOMON, B.; FESSI, H.; CHARCOSSET, C. Preparation of Bovine Serum Albumin (BSA) nanoparticles by desolvation using a membrane contactor: A new tool for large scale production, *European Journal of Pharmaceutical and Biopharmaceutics*, v. 85, p. 398-405, 2013.
- YIH, T. C.; AL-FANDI, M. Engineered nanoparticles as precise drug delivery systems, *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 97, p. 1184-1190, 2006.
- YOU, J. S.; JONES, P. A. Cancer Genetics and Epigenetics: Two Sides of the Same Coin?, *Cancer Cell*, v. 22, p. 9-20, 2013.
- YU, M.; WU, J.; SHI, J.; FAROKHZAD, O. C. Nanotechnology for protein delivery: Overview and perspectives, *Journal of Controlled Release* 2015.
- ZANOTTO-FILHO, A.; CORADINI, K.; BRAGANHOL, E.; SCHRODER, R.; DE OLIVEIRA, C. M.; SIMÕES-PIRES, A.; BATTASTINI, A. M. O.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; FORCELINI, C. M.; BECK, R. C. R.; MOREIRA, J. C. F. Curcumin-loaded lipid-core nanocapsules as a strategy to improve pharmacological efficacy of curcumin in glioma treatment, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 83, p. 156-167, 2013.
- ZHANG, L. J.; WEBSTER, T. J. Nanotechnology and nanomaterials: Promises for improved tissue regeneration, *Nano Today*, v. 4, p. 66-80, 2009.
- ZHANG, L. J.; ZHANG X, H.; LIAO, P. Y.; SUN, J. J.; WANG, L.; YAN, Y. J.; CHEN, Z. L. Antitumor activity evaluation of meso-tetra (pyrrolidine substituted) pentylporphin-mediated photodynamic therapy in vitro and in vivo, *Journal of Photochemistry and Photobiology*, v. 163, p. 223-231, 2016.
- ZORZI, G. K.; CARVALHO, E. L. S.; VON POSER, G. L.; TEIXEIRA, H. F. On the use of nanotechnology-based strategies for association of complex matrices from plant extracts, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 25, p. 426-436, 2015.

