



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE FILOSOFIA, CIÊNCIAS E LETRAS DE
RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

HIAGO SALGE BORGES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE
NANOEMULSÃO MULTI-CARREGADA: PROTOPORFIRINA IX,
INDOCIANINA VERDE E CBD PARA TRATAMENTO DE
GLIOBLASTOMA POR TERAPIA FOTODINÂMICA.**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023



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

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão multi-carregada: Protoporfirina IX, Indocianina Verde e CBD para tratamento de glioblastoma por Terapia fotodinâmica.

Hiago Salge Borges

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**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2023

Hiago Salge Borges

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão multi-carregada:
Protoporfirina IX e Indocianina Verde, CBD para tratamento de glioblastoma por
Terapia fotodinâmica.

Dissertação de Mestrado apresentado ao
Programa de Pós-Graduação em Química da
Universidade de São Paulo, Faculdade de
Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto
para obtenção do título de Mestre em
Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio
Tedesco

FICHA CATALOGRÀFICA

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste estudo, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citado a fonte.

Salge Borges, Hiago

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão multi-carregada: Protoporfirina IX e Indocianina Verde, CBD para tratamento de glioblastoma por Terapia fotodinâmica. Ribeirão Preto, 2023.

112 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo – Área de concentração: Química.

Orientador: Claudio Tedesco, Antônio.

1. Nanoemulsões lipídicas. 2. Terapia Fotodinâmica. 3. Glioblastoma. 4. Canabidiol.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Hiago Salge Borges

Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão multi-carregada: Protoporfirina IX, Indocianina Verde e CBD para tratamento de glioblastoma por Terapia fotodinâmica.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade de São Paulo, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientado: Hiago Salge Borges.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr.: _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

Agradeço aos meus pais e ao meu irmão por terem me proporcionado as oportunidades de estudar, realizar os meus sonhos e ter a abertura de mostrar quem eu sou, como ser humano.

Agradecimento

Agradeço aqueles que acreditaram na minha capacidade, neste estudo e aqueles que contribuíram de alguma forma para que fosse concluído e eu conseguisse chegar no fim dessa aventura.

Primeiramente obrigado ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Claudio Tedesco, pela confiança, pela oportunidade, por toda a ajuda e apoio e principalmente paciência, no desenvolvimento do projeto e para que eu tivesse condições de segui-lo.

Aos meus pais, por todo o apoio, afeto e amor incondicional que eu poderia ter; um porto seguro e um farol, mesmo com toda as intempéries. Ao meu irmão que sempre posso contar com um ombro amigo e de companheirismo. Aos demais familiares que também sempre me apoiaram de várias maneiras, palavras não simbolizam o quanto sou grato.

Aos meus amigos, Flávia, Henrique, Hellen, Luiza, Nayara, Samara, Bárbara, Luandra e tantos outros que me acompanharam nessa jornada no Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, e que faziam questão de estar presente fora dela, a Olimpia por sempre ajudar nas correrias do laboratório, e embarca nas nossas loucuras, muito obrigado. Meus amigos de Uberaba e aqueles da graduação que me apoiaram nessa aventura da pós em várias maneiras. Ao meu amigo, companheiro e namorado, Leonardo, que me apoiou bastante e me ajuda a distrair da rotina e torná-la mais leve.

Um agradecimento especial aos professores e funcionários do Departamento de Química, além de tantos outros colaboradores, que apoiam nosso estudo no laboratório.

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, juntamente com a FAPESP.

“Serve-te da prudência como chumbo para os pés que te permita avançar lentamente. Não tenhas pressa em responder “sim” ou “não”, pois se revela o mais tolo entre os tolos quem sem meditação afirma ou nega; eis que num e noutra caso cumpre ter ponderação, sendo a afoiteza causa de que muitas vezes a opinião geral conclua erroneamente com a paixão e não com o raciocínio.”

Dante Alighieri.

Borges, Hiago Salge. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsão multi-carregada: Protoporfirina IX, Indocianina Verde e CBD para tratamento de glioblastoma por Terapia fotodinâmica.** 2023. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade de São Paulo.

Resumo

O glioma é considerado o tipo mais comum de tumor originário do sistema nervoso central. Atualmente, o tratamento do glioblastoma depende da localização, do tipo celular em questão e do grau de malignidade. A abordagem terapêutica geralmente consiste em uma combinação de diferentes procedimentos, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que apresentam baixo prognóstico. Assim, as propostas deste estudo visam desenvolver e explorar a nanobiotecnologia com aplicações práticas e clínicas da terapia fotodinâmica, com o uso de fármacos como canabinóides (CBD) e fotossensibilizadores (FS): indocianina verde (ICG) e protoporfirina IX (PpIX), como forma de contornar limitações comuns no prognóstico, tratamento e recuperação de doenças neurológicas. O primeiro foco deste estudo foi desenvolver uma nanoemulsão com todos os componentes descritos acima, juntamente com os estudos de quantificação e avaliações de estabilidade. O uso da nanobiotecnologia tem sido pouco explorado nas ciências neurológicas como forma de liberação de fármacos no sistema nervoso central; Os materiais nanobiológicos possuem grande versatilidade em proporcionar liberação contínua e programada de fármacos por meio do encapsulamento de fármacos, além de mantê-los em concentrações adequadas, quando necessário no sistema nervoso central. Essa administração direta evita efeitos sistêmicos indesejáveis, evita a dificuldade de penetração na barreira hematoencefálica e a perda da atividade biológica do fármaco devido ao metabolismo de primeira passagem pelo sistema hepático.

Palavras-chave: Nanoemulsões lipídicas, Terapia Fotodinâmica, Glio.

Borges, Hiago Salge. **Development and characterization of multi-charged nanoemulsion: Protoporphyrin IX, Indocyanine Green, and CBD for treatment of glioblastoma by Photodynamic Therapy**. 2023. Dissertation (Master in Chemistry) – University of São Paulo.

Abstract

Glioma is considered the most common type of tumor originating in the central nervous system. Currently, the treatment for glioblastoma depends on the location, the cell type in question, and the degree of malignancy. The therapeutic approach consists of a combination of different procedures, such as surgery, radiotherapy, and chemotherapy, which have a low prognosis. With this, the proposals of this study aim to develop and explore nanobiotechnology with practical and clinical applications of photodynamic therapy, with the use of nanocarriers such as cannabinoids (CBD) and photosensitizers (PS): indocyanine green (ICG) and protoporphyrin IX (PpIX), to circumvent common limitations in the prognosis, treatment, and recovery of neurological diseases. The first focus of this work was to develop a nanoemulsion with all the components described above, together with the quantification studies and stability evaluations. The use of nanobiotechnology has been little explored in the neurological sciences as a way of delivering drugs to the central nervous system; Nanobiological materials have great versatility in providing continuous and programmed release of drugs through drug encapsulation, in addition to maintaining them in adequate concentrations, when necessary, within the central nervous system. This direct administration avoids undesirable systemic effects, prevents difficulty penetrating the Blood-brain barrier and the loss of biological activity of the drug due to first-pass metabolism through the hepatic system.

Keywords: Lipid nanoemulsions, Photodynamic Therapy, Glioma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação e diagnóstico histológico dos gliomas.	3
Figura 2 - Comparação de sistemas de cultura de células 2D e 3D.	5
Figura 3 - Resposta imunológica produzida pela terapia fotodinâmica (TFD) após irradiação de luz sobre a célula de câncer tratada com fotossensibilizador (FS).....	11
Figura 4 - Estrutura da Protoporfirina IX.	12
Figura 5 - Estrutura da Indocianina Verde.	14
Figura 6 - Estrutura do Canabidiol (CBD).	15
Figura 7 - Estrutura dos tensoativos.	Erro! Indicador não definido.
Figura 8 - Estrutura química do Triglicerídeo Caprílico/cáprico.	Erro! Indicador não definido.
Figura 9 - Representação esquemática da produção da nanoemulsão.	Erro! Indicador não definido.
Figura 10 - Representação esquemática dos princípios da tecnologia STEP™.	Erro! Indicador não definido.
Figura 11 - Reação de redução do MTT a formazan.	Erro! Indicador não definido.
Figura 12 - Esquema do sistema de irradiação com fibra-óptica difusa usado nos estudos de fotoestimulação (luz monocromática $\lambda = 430$ nm).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 13: Esquema do sistema de irradiação com fibra-óptica usado nos estudos de foto estimulação (luz monocromática $\lambda = 780$ nm – 810 nm).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 14 - Resultados de diâmetros médios e índice de polidispersão das formulações com crodamol e Kolliphor para comparação; Resultados de potencial zeta respectivamente.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 15 - Resultados de diâmetros médios e índice de polidispersão e potencial zeta respectivamente. da formulação de crodamol completa (NE-CC P.I.C.).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 16 - Gráfico com dados de pH das nanoemulsões a 25 °C em dias diferentes.	Erro! Indicador não definido.
Figura 17 - Espectros de absorção na região do UV-vis e curvas analíticas padrão com os máximos comprimentos de onda de absorção para PpIX (405 nm em DMSO), ICG (780 nm em metanol) e CBD (275 nm em metanol), respectivamente, em concentrações crescentes.	Erro! Indicador não definido.
Figura 18 - Espectros de emissão de fluorescência com a excitação: para PpIX (615 nm em DMSO), ICG (790 nm em metanol) e CBD (330 nm em metanol), respectivamente, em concentrações crescentes.	Erro! Indicador não definido.
Figura 19 - Espectro de absorção da nanoemulsão completa NE-CC P.I.C.	Erro! Indicador não definido.
Figura 20 - Espectros de emissão do CBD representados por nanoemulsão livre e nanoemulsão filtrada em Amicon 10kDa.	Erro! Indicador não definido.
Figura 21 - Cromatograma de padrões de CBD livre em metanol nas concentrações crescentes e picos da nanoemulsão e da filtração em Amicon 10 KDa, respectivos.	Erro! Indicador não definido.
Figura 22 - Curvas analíticas dos espectros de absorção do CBD livre em metanol pela cromatografia.	Erro! Indicador não definido.
Figura 23 - Perfis de instabilidade: posição na cubeta (nm) por transmitância das amostras de nanoemulsão com tensoativos diferentes.	Erro! Indicador não definido.
Figura 24 - Perfis de estabilidade acelerada das amostras de nanoemulsão separadas dos fotossensibilizadores e do nanocarreador.	Erro! Indicador não definido.
Figura 25 - Fotomicrografias eletrônicas de transmissão das formulações a) NE-CC com PpIX e ICG apenas e NE-CC P.I.C..	Erro! Indicador não definido.
Figura 26 - Micrografia de diferentes linhagens celulares, capturadas com um microscópio Axiovert 40-CFL (Carl Zeiss).....	Erro! Indicador não definido.
Figura 27 - Esferoide produzido utilizando a célula a) T98G e b) U87MG, com lente de aumento de 10x. Fotografia adquirida pelo microscópio óptico Axiovert 40-CFL (Carl Zeiss).	Erro! Indicador não definido.
Figura 28 - Curva de crescimento celular em monocamada das linhagens utilizadas neste estudo.	Erro! Indicador não definido.
Figura 29: Microscopia de fluorescência Confocal da distribuição da PpIX veiculada na NE-CC P.I.C., nas células de glioblastoma: T98G e U87MG, respectivamente.	Erro! Indicador não definido.
Figura 30 - Viabilidade celular da NHF com NE-CC vazia em diferentes proporções.	Erro! Indicador não definido.

- Figura 31 - Viabilidade das células NHF com a NE-CC P.I.C em diferentes proporções.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 32 - Viabilidade da formulação vazia com o tensoativo Kolliphor...**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 33 - Viabilidade da formulação vazia com o tensoativo Croduret. ..**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 34 - Viabilidade da formulação completa para as duas células de glioblastoma.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 35 - Viabilidade da formulação com as adições de ICG, PpIX e CBD separadamente na célula U87MG.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 36 - Viabilidade da formulação com as adições de ICG, PpIX e CBD separadamente na célula T98G.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 37 - Viabilidade das células U87MG e T98G após tratamento com o laser 430 nm, em diferentes doses.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 38 - Viabilidade da células T98G e U87MG após tratamento com nanoemulsão vazia e completa mais incidência com o laser 430 nm, em diferentes doses.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 39 - Viabilidade das células U87MG e T98G após tratamento com o laser 810 nm, em diferentes doses.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 40 - Viabilidade da células T98G e U87MG após tratamento com nanoemulsão completa e tratamento com o laser 810 nm, em diferentes doses.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 41 - Viabilidade da cultura tridimensional das células U87MG e T98G após incidência do laser 430 e 810 nm, em doses diferentes.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 42 - Citotoxicidade da NE-CC P.I.C. sobre a cultura tridimensional das células U87MG e T98G com a formulação completa.**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 43 - Viabilidade da cultura tridimensional das células U87MG e T98G após tratamento com a nanoemulsão completa e a incidência do laser 430 nm, em doses diferentes.....**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 44 - Viabilidade da cultura tridimensional das células U87MG e T98G após tratamento com a nanoemulsão completa e a incidência do laser 810 nm, em doses diferentes.....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE TABELA

- Tabela 1 - Dados médios de tamanho, polidispersão e potencial zeta das nanoformulações acompanhado pelo período de dois meses.....**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 2 - Parâmetros analíticos obtidos pelas curvas de calibração por espectroscopia de absorção na região do UV-vis para cada um dos ativos utilizados: PpIX, ICG e CBD.**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 3 - Parâmetros analíticos obtidos pelas curvas de calibração por espectroscopia de emissão para cada um dos ativos utilizados: PpIX, ICG e CBD.**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 4 - Concentração (mM e μ M) dos fármacos CBD, PpIX e ICG, respectivamente, incorporados na nanoemulsão (NE-CC P.I.C.).**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 5 - Dados da instabilidade pelo LUMisizer das formulações e Aceleração centrífuga relativa (RCA) da rotação.**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 6 - Taxa de velocidade de separação representada pela inclinação e calculado pelo software SEPView, depois de integrar os arquivos de transmissão.**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 7 - Resultado dos tempos de vida de prateleira (shelf life) de cada amostra.**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 8 - Diâmetros médios analisadas pelas micrografias MET.....**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 9 - Tempo de incidência do laser 430 nm.....**Erro! Indicador não definido.**
- Tabela 10 - Tempo de incidência do laser 810 nm.....**Erro! Indicador não definido.**

LISTA DE ABREVIACOES

HAc	Ácido acético glacial
Abs	Absorbância
CBD	Canabidiol
DMSO	Dimetilsulfóxido
EROs / ROSs	Espécies Reativas de Oxigênio
FO	Fase orgânica
FA	Fase aquosa
FF	Fármaco Fotossensibilizador
FS	Fotossensibilizador
ICG	Indocianina Verde
ISO	International Organization for Standardization
MeOH	Metanol
M	Molar (mol. L ⁻¹)
mV	Milivolts
NE	Nanoemulsão
NE-CC Vazia	Nanoemulsão vazia
NE-CC P.I.C.	Nanoemulsão com os ativos: PpIX, ICG e CBD
nm	Nanômetros
PdI	Índice de polidispersão
PpIX	Protoporfirina IX
PBS	Tampão fosfato
<i>RPMI</i>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>
SNC	Sistema Nervoso Central
TIF	Temperatura de Inversão de Fase
TFD	Terapia Fotodinâmica
UV	Ultravioleta
ζ	Potencial zeta (mV)

Sumário

LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELA	v
LISTA DE ABREVIACÕES	vi
1. Introdução:.....	1
1.1. O cenário do Câncer.....	1
1.1.1. Glioblastoma.....	2
1.2. Terapias aplicadas nos tratamentos	3
1.3. Esferoides Multicelulares (Cultura celular tridimensional – 3D) por levitação magnética ..	4
1.4. Sistemas de Liberação de fármacos.....	6
1.5. A nanotecnologia aplicada e sistemas de carreadores	6
1.6. Nanoemulsões	7
1.7. Terapia Fotodinâmica (TFD).....	10
1.8. Os fármacos fotossensibilizantes.....	11
1.8.1. A protoporfirina	11
1.8.2. Indocianina Verde.....	13
1.9. O canabidiol (CBD) e suas contribuições	14
2. Objetivos:	16
2.1. Objetivos gerais.....	16
2.2. Objetivos específicos:	16
3. Materiais e reagentes:	Erro! Indicador não definido.
3.1. Equipamentos.....	Erro! Indicador não definido.
4. Métodos experimentais:.....	Erro! Indicador não definido.
4.1. Produção da nanoemulsão pelo método de inversão de fase (TIF).	Erro! Indicador não definido.
4.2. Determinação de pH.....	Erro! Indicador não definido.
4.3. Determinação de tamanho médio, polidispersabilidade e potencial zeta.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.1. Tamanho de partícula por espalhamento dinâmico de luz.....	Erro! Indicador não definido.
4.3.2. Determinação do potencial zeta por mobilidade eletroforética.....	Erro! Indicador não definido.
4.4. Avaliação dos sistemas nano emulsificados na presença e ausência dos ativos por métodos analíticos espectrofotométricos e espectrofluorimétricos.	Erro! Indicador não definido.
4.4.1. Linearidade	Erro! Indicador não definido.
4.4.2. Limite de Detecção e Limite de Quantificação.....	Erro! Indicador não definido.
4.4.3. Avaliação do conteúdo total dos ativos nos sistemas nanoemulsionados NE.....	Erro! Indicador não definido.
4.4.4. Eficiência de incorporação (EI) da NE.	Erro! Indicador não definido.

- 4.4.5. Eficiência de incorporação (EI) por Cromatografia Líquida de Alta Pressão (CLAE – HPLC) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.5. Estudo de estabilidade de longo prazo / Shelf Life. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.5.1. Estabilidade da NE ao longo do tempo. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.5.2. Estabilidade acelerada das formulações NE. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6. Avaliação morfológica das formulações NE. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.6.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7. Cultura Celular. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.1. Glioblastomas U87MG e T98G (ATCC HTB-14™ e CRL-1690™, respectivamente) e Fibroblasto NHF (Normal Human Fibroblast)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.2. Cultivo das linhagens U87MG e T98G em modelo tridimensional esférico (3D). **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.3. Viabilidade para os estudos em monocamada (2D) e tridimensional (3D). **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.4. Estudo de fototoxicidade *in vitro*. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.5. Estudo de citotoxicidade em células tridimensionais. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.6. Estudo de fototoxicidade e fotobioestimulação *in vitro* em esferóides. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.7. Estudos de taxa de internalização celular dos sistemas nano emulsionados (Uptake) **Erro! Indicador não definido.**
- 4.7.8. Análise de microscopia Confocal de fluorescência em monocamada tratada com a NE. **Erro! Indicador não definido.**
- 4.8. Análise estatística. **Erro! Indicador não definido.**
5. Resultados e Discussão:..... **Erro! Indicador não definido.**
- Parte I : Preparo e caracterização da nanoemulsão..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.1. Determinação do tamanho de partículas e de potencial zeta das formulações **Erro! Indicador não definido.**
- 5.2. Determinação do pH das nanoemulsões..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.3. Curva Analítica Padrão dos fotoativos e aditivos utilizados (Espectroscopia UV-Vis e Emissão de Fluorescência). **Erro! Indicador não definido.**
- 5.4. Determinação da concentração total de ativos nas nanoemulsões **Erro! Indicador não definido.**
- 5.5. Eficiência de Incorporação (EI) **Erro! Indicador não definido.**
- 5.6. Monitoramento da estabilidade acelerada das formulações. **Erro! Indicador não definido.**
- 5.7. Análise morfológica por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) das nanoemulsões na presença e na ausência dos ativos. **Erro! Indicador não definido.**
- Parte II : Ensaios In Vitro..... **Erro! Indicador não definido.**
- 5.8. Cultura celular de Fibroblasto NHF e Glioblastomas U87MG e T98G (ATCC HTB-14™ e CRL-1690™, respectivamente). **Erro! Indicador não definido.**
- 5.8.1. Análise da cinética de crescimento e tempo de dobra populacional (Doubling Time) das linhagens celulares. **Erro! Indicador não definido.**
- 5.9. Avaliação com base em microscopia Confocal de fluorescência. **Erro! Indicador não definido.**
- 5.10. Ensaio de biocompatibilidade e citotoxicidade celular em linhagem de fibroblasto NHF. **Erro! Indicador não definido.**
- 5.11. Estudo de citotoxicidade nas linhagens de Glioblastoma. **Erro! Indicador não definido.**

5.12.	Estudo de Fototoxicidade nas linhagens de Glioblastoma.	Erro! Indicador não definido.
5.13.	Estudo de citotoxicidade em células tridimensionais.....	Erro! Indicador não definido.
6.	Conclusões:.....	17
7.	Referência:.....	18

1. Introdução:

1.1. O cenário do Câncer

O câncer é um grande grupo de doenças que podem começar em quase qualquer órgão ou tecido do corpo, quando células anormais crescem descontroladamente, ultrapassam seus limites usuais para invadir partes adjacentes do corpo e se espalhar para outros órgãos (FERLAY J, 2012). O último processo é chamado de metástase e é uma das principais causas de morte por câncer. Neoplasia e tumor maligno são outros nomes comuns para câncer.

Segundo a Organização Mundial de Saúde o câncer é a segunda principal causa de morte no mundo, responsável por cerca de 10 milhões de mortes, uma em cada seis mortes, em 2020 (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). Os cânceres de pulmão, pele, próstata, colorretal, estômago e fígado são os tipos mais comuns de câncer em homens, enquanto mama, câncer colorretal, pulmão, colo do útero e tireoide são os mais comuns entre as mulheres (FERLAY et al., 2021).

O tecido e o tipo de célula do local de origem da multiplicação é o que distingue os diferentes tipos de câncer, aproximadamente 85 % dos cânceres acometem células epiteliais e são classificados como carcinomas. Aqueles originados de células da mesoderme são chamados de sarcomas, e cânceres de tecidos glandulares são chamados adenocarcinomas (PECORINO L., 2012). Os cânceres originados de células sanguíneas e nervosas são denominados respectivamente hematopoiéticos e neuroectodermis (estes responsáveis pelos que seriam os gliomas). Os tumores cuja origem não pode ser identificada em função de suas células terem se desdiferenciado (perderam todas as características tecido-específicas), são ditos anaplásicos (JIANG et al., 2021; WEINBERG, 2008).

A distinção entre os tumores leva em consideração o crescimento celular e a capacidade de disseminação para outras regiões. Onde os benignos não disseminam metástases, embora alguns apresentem maior risco de vida devido a sua localização e por liberarem altos níveis de hormônios que geram desequilíbrios fisiológicos no organismo (LAMBERT; PATTABIRAMAN; WEINBERG, 2017; WEINBERG, 2008). Por outro lado, os tumores malignos não permanecem isolados, com a particularidade de invasão e metástase. Mais especificamente, são as metástases disseminadas por estes tumores que são responsáveis por cerca de 90 % dos óbitos causados por câncer (PECORINO, 2021).

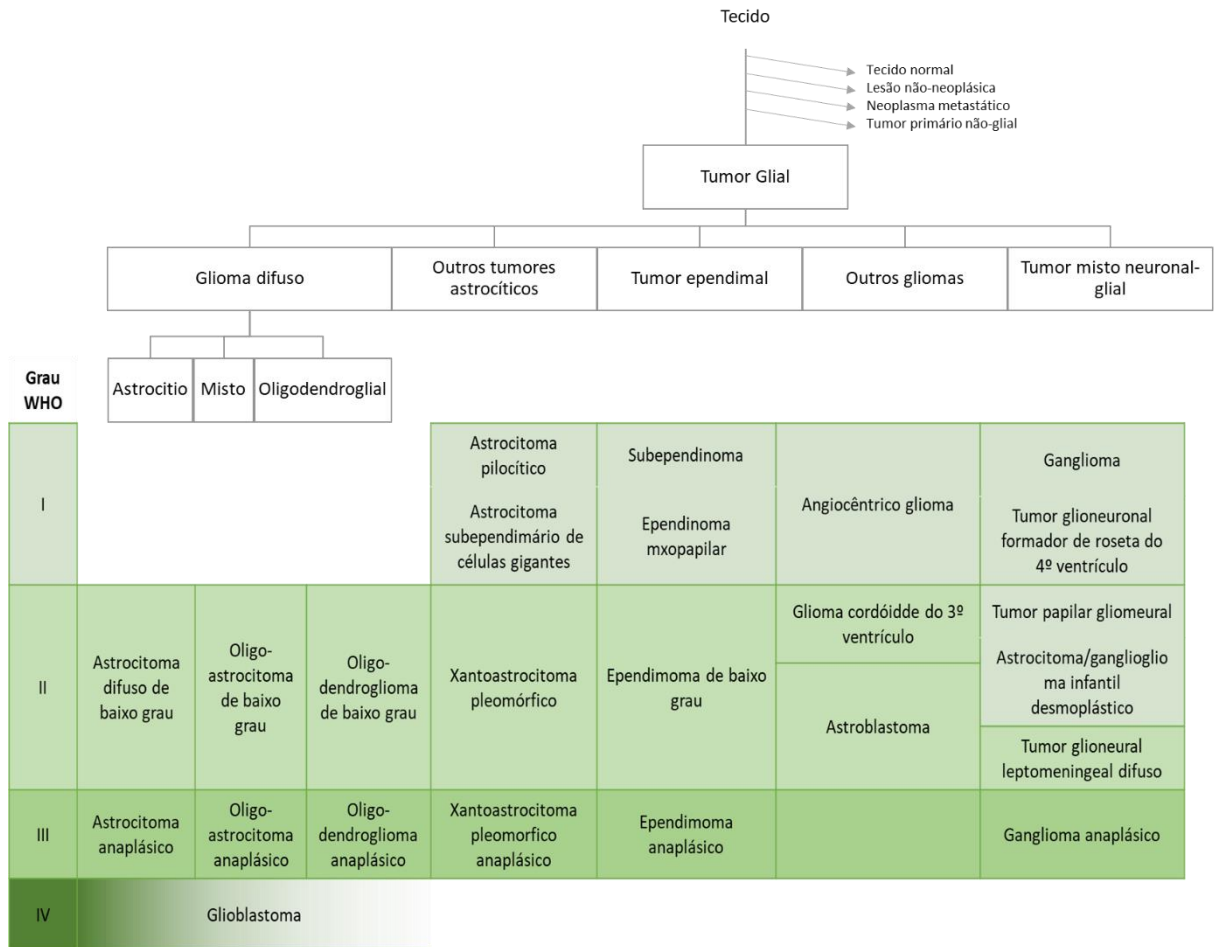
As doenças cerebrais são consideradas um grande desafio à saúde, uma vez que a administração de fármacos no cérebro apresenta certos obstáculos como à barreira hematoencefálica (BBB, do inglês *Blood-brain barrier*) (BLAKELEY, 2008; SILBERBERG et al., 2015). Essa barreira foi descoberta, e identificada a posteriori, em 1960 pelo cientista alemão Paul Ehrlich e um de seus alunos, Edwin Goldman, pela adição de um corante diretamente na corrente sanguínea de ratos, observando-se um tempo de biodistribuição no qual existia uma menor afinidade do corante no cérebro, contrário ao que foi observado quando o mesmo foi adicionado diretamente sobre o órgão do mesmo animal (DYRNA et al., 2013). Esses estudos comprovaram a existência de uma barreira biológica celular diferenciada de todas as outras. Tem se observado um número crescente de doenças do sistema nervoso central (SNC) nas últimas décadas. Dentre os tumores cerebrais, 80 % (segundo dados do INCA no ano de 2020) (ARTHUR ORLANDO CORRÊA SCHILITZ, 2019; VALADARES et al., 2021), são do tipo glioblastomas.

1.1.1. Glioblastoma

Os glioblastomas (GBM) são tumores malignos (cancerosos) de grau 4, onde uma grande parte das células tumorais está se reproduzindo e se dividindo a qualquer momento (BLEEKER; MOLENAAR; LEENSTRA, 2012). O tumor é composto predominantemente por células astrocitárias anormais, mas também contém uma mistura de diferentes tipos de células (incluindo vasos sanguíneos) e áreas de células mortas (necrose). Eles são nutridos por um suprimento sanguíneo anormal dos vasos tumorais, por onde também os glioblastomas são infiltráveis e invadem regiões próximas do cérebro. É válido destacar que é extremamente raro que os glioblastomas se espalhem para fora do cérebro (JIGISHA P THAKKAR; PIER PAOLO PERUZZI; VIKRAM C PRABHU, 2020; MANMEET AHLUWALIA, 2022).

Na **Figura 1** podemos entender como funciona a classificação em graus que o GBM apresenta no seu desenvolvimento.

Figura 1 - Classificação e diagnóstico histológico dos gliomas.



Fonte 1: Adaptado de (PERRY et al., 2016).

Os GBMs são bastante complexos por terem a possibilidade de surgir de novo (recidiva), o que significa que começam como um tumor de grau 4 sem evidência de um precursor de grau inferior (PERRY; WESSELING, 2016). Dessa forma, eles tendem a ser mais agressivos e são mais comuns em pacientes com 60 anos de idade ou mais, embora pacientes mais jovens também possam ser afetados. Alternativamente, os glioblastomas secundários podem progredir de tumores astrócitos de grau inferior (grau 2 ou 3) e evoluir para tumores de grau 4 ao longo do tempo. Em geral, esses tumores tendem a ter um crescimento inicial mais lento, mas podem se tornar progressivamente agressivos (DORSEY JF, 2020).

1.2. Terapias aplicadas nos tratamentos

O tratamento comum para os GBMs é a cirurgia/ressecção, seguida de radioterapia e quimioterapia, onde o objetivo é remover o máximo possível do tumor sem ferir o tecido

cerebral normal circundante, necessário para as funções neurológicas (DORSEY JF, 2020). Em suma, a cirurgia fornece a capacidade de reduzir a quantidade de tecido tumoral sólido dentro do cérebro, remover as células no centro do tumor, que podem ser resistentes à radiação e/ou quimioterapia e reduzir a pressão intracraniana, prolongando a vida de alguns pacientes e melhorando a qualidade de vida restante (BAUMERT et al., 2016). Essas cirurgias são frequentemente orientadas por imagem assistida pelo computador e, às vezes, usando técnicas de mapeamento intraoperatório para determinar as localizações do córtex motor, sensorial e de fala/linguagem (BOR-SENG-SHU, 2016).

Com todas essas características, somadas à altas taxas de reincidência, observa-se uma necessidade crescente no desenvolvimento de novas estratégias eficazes nos tratamentos e administração de fármacos, com ativos hidrofílicos, hidrofóbicos e até de outros ativos cerebrais que induzam e auxiliem a superação das limitações de biodistribuição dos mesmos, causando o insucesso de muitos tratamentos para doenças como Alzheimer e Parkinson e nestes casos de tumores cerebrais (OBEROI et al., 2016). Os usos de sistemas nanoestruturados na veiculação de ativos se apresenta como uma alternativa excelente para o tratamento desses tumores geneticamente heterogêneos; e em conjunto com outras técnicas, como por exemplo, a ressecção cirúrgica, radioterapia e a quimioterapia.

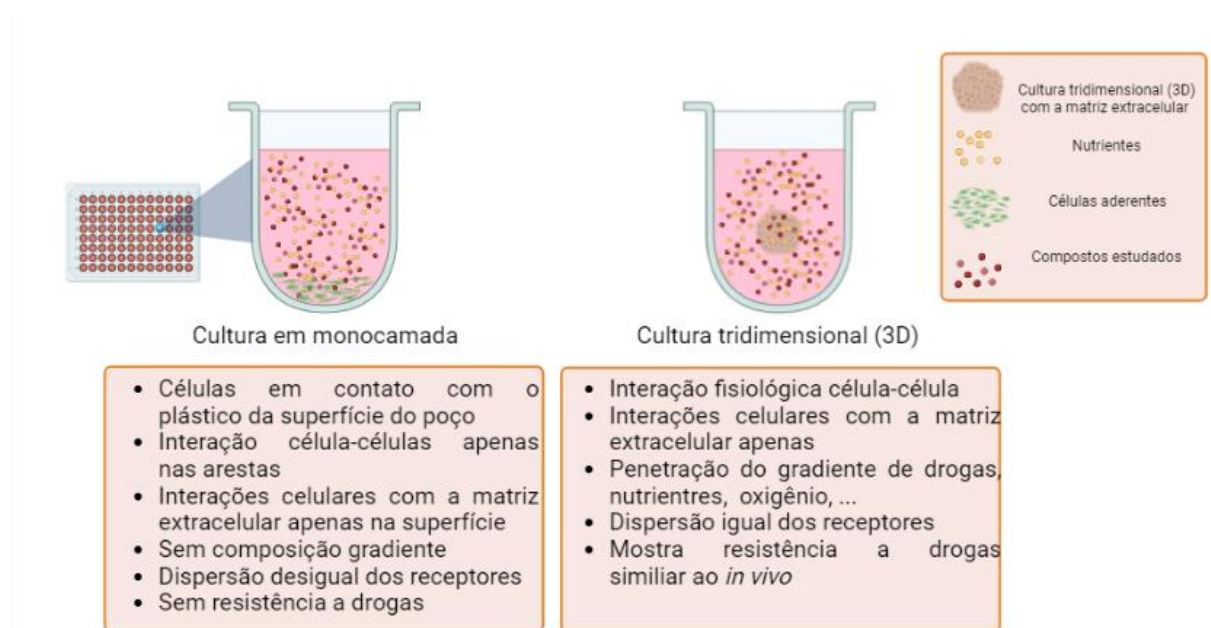
1.3. Esferoides Multicelulares (Cultura celular tridimensional – 3D) por levitação magnética

Os esferoides de culturas celular começaram a ser desenvolvidos por Sutherland e colaboradores, em 1970 para reproduzir um fenótipo funcional das células tumorais humanas e suas respostas à radioterapia. Esses esferoides representam agregados de células tridimensional (3D) e são utilizados para assemelhar aos tecidos *in vitro*. (FANG; EGLIN, 2017; FENNEMA et al., 2013).

Nos tecidos vivos, as células existem em microambientes com complexas interações célula-célula e célula-matriz e dinâmicas de transporte complexas para nutrientes e célula. Embora a cultura celular padrão 2D ou monocamada tenha sido crucial para o desenvolvimento da biologia moderna, ela recria imprecisamente o ambiente natural no qual as células estão situadas. Essa falta de fidelidade ao tecido nativo pode ser uma limitação em muitas situações, incluindo a triagem de alguns fármacos quanto sua toxicidade e eficácia (SOUZA et al., 2010).

Logo, diferentemente das células em monocamada 2D, os esferóides desenvolvem importantes parâmetros fisiológicos de tumores heterogêneos como: interações justas célula-célula; exposição a gradientes de oxigênio, pH, nutrientes, fatores de crescimento, metabolitos e sinais solúveis para gerar zonas necróticas, hipóxias e proliferativas do núcleo interno à superfície. De forma semelhante, gradientes de fármacos anticâncer também são gerados dentro dos esferóides partindo do exterior para o núcleo interno (FANG; EGLIN, 2017). Demonstrado na **Figura 2** a seguir.

Figura 2 - Comparação de sistemas de cultura de células 2D e 3D. (A) cultura de células 2D, (B) cultura de células 3D.



Fonte 2: Adaptado de (SAMIMI et al., 2021).

Alguns grupos em que esses modelos tridimensionais podem se basear, dependendo da natureza das células utilizadas para sua formação. No presente estudo, focou-se no desenvolvimento de esferóides tumorais multicelulares, formados em condições não aderentes da cultura e suspensão celular (WEISWALD; BELLET; DANGLES-MARIE, 2015).

Uma técnica bastante utilizada é o emprego de substratos de baixa aderência que agem como modificadores químicos das superfícies para as tornarem pouco aderentes. O método mais comum para obter uma superfície de baixa aderência é através do revestimento da superfície com agarose, polietileno glicol, galactose, álcool polivinílico e diversos outros. As placas utilizadas são conhecidas como *Ultra-Low Attachment Well Plate*, com poços em formato em U, revestidas com o material que impede a aderência (LIU; CHEN; WIN NAING, 2021).

A levitação magnética é uma técnica mais recente e foi escolhida para formação de esferóides neste estudo. Nesse método, as células são magnetizadas com nanopartículas paramagnéticas (NanoShuttle-PL, Greiner,) que apresentam entre seus componentes biocompatíveis: ouro, óxido de ferro e poli-L-lisina (PLL). A fixação ocorre por meio de interação eletrostática de pequenas quantidades de NanoShuttle-PL, estes agregados pelo PLL nas células, estes componentes são atóxicos e não afetam a proliferação e nem induzem uma resposta inflamatória, não interferindo na cultura celular e sendo neutro em relação a matriz extracelular. Após a aplicação, uma placa magnética é utilizada abaixo ou acima para que o processo de agregação ocorra ou seja facilitado, podendo ser auxiliado com o uso de placas não aderentes. (*Ultra-Low Attachment Well Plate*). Essa agregação é um processo rápido em comparação com o método anterior, além de prover um aumento na reprodutibilidade das esferas, diminuindo também o risco quanto a perda de esferóides na manutenção de meio e demais movimentações (HAISLER et al., 2013b; SHAO et al., 2020).

1.4. Sistemas de liberação de fármacos

A baixa solubilidade e a baixa biodisponibilidade de ativos e fotoativos sempre foram preocupações importantes no desenvolvimento de fármacos, porque dificultam o processo de produção, controle da dosagem adequada e liberação da mesma no corpo humano, principalmente as mais lipofílicas (ADEPU; RAMAKRISHNA, 2021; SANTOS, 2013). Como muitas dos fármacos recém-descobertas (quase 40 %) têm baixa solubilidade em água ou são completamente hidrofóbicas, o interesse das pesquisas tem sido gradualmente direcionado, nas últimas duas décadas, para projetar sistemas de veiculação de fármacos e ativos relativamente inertes e não tóxicos que possam fornecer aos medicamentos uma forma eficiente para as células vivas, em comparação com outros métodos. (SAVJANI; GAJJAR; SAVJANI, 2012)

1.5. A nanotecnologia aplicada e sistemas de carreadores

A nanotecnologia voltada para a nanociência e aplicação da nanomedicina já se apresenta como uma solução inovadora a veiculação de ativos e fármacos a algumas décadas (DIMER et al., 2013a). Como exemplo de sistemas de liberação nanoestruturados destacam-se as nanopartículas poliméricas, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, nanoemulsões, micelas e dendrímeros (DEVALAPALLY; CHAKILAM; AMIJI, 2007).

As nanopartículas e nanoemulsões têm sido desenvolvidas com diferentes tipos de materiais orgânicos, inorgânicos, híbridos, ligas e compósitos, geralmente são produzidas em diferentes morfologias como esféricas, hastes, cilindros, estrelas e gaiolas. As características mais interessantes dos nanoemulsões (NEs) são seus tamanhos menores e alta razão superfície-volume que oferecem grande superfície disponível para fixação/ancoragem eletrostática de ligantes ou porções específicas, para projetar NEs para uma grande variedade de aplicações (ÇINAR, 2017).

Os medicamentos podem ser carregados no conjunto núcleo-casca dos nano transportadores por meio de encapsulamento e fixação ou aprisionamento de superfície. Dentre os diferentes tipos de nanocarreadores, os nanocarreadores à base de lipídios ganharam muita importância para a entrega de fármacos lipofílicos devido às suas características especiais como alta capacidade de carga, alta biocompatibilidade (estável em meios fisiológicos e inerte a tecido), baixa toxicidade, superfície adaptável para aplicar qualquer tipo de estratégia de direcionamento e uma melhor biodistribuição e perfil farmacocinético (SINGH et al., 2017a).

Além disso, estes carreadores coloidais podem apresentar as seguintes vantagens: prolongar a permanência do fármaco na corrente sanguínea (comum aumento da meia-vida plasmática), proteger o princípio ativo da degradação química ou enzimática após administração, diminuir os efeitos colaterais e aumentar a biodisponibilidade (HUSE; HOLLAND, 2010; MARTINS, 2017)

Desta maneira, utilizar nanocarreadores vem sendo uma alternativa auspiciosa para o transporte através do endotélio cerebral visando nova abordagem e protocolos para o tratamento das patologias do SNC (MORA-HUERTAS; FESSI; ELAISSARI, 2010). Uma vez incorporados, os ativos podem gerar mudanças moleculares importantes para a resposta biológica que será induzida por uma reação fotobiológica.

1.6. Nanoemulsões

Vários princípios ativos apresentam características físico-químicas como a hidrofiliabilidade e os pesos moleculares, são pouco favoráveis à passagem de barreiras biológicas que separam o local de administração e seu sítio de ação. No entanto, essa tecnologia ajuda a carrear moléculas, que funcionem como transportadores nanométricos. Essas partículas, quando em contato com estruturas típicas do tecido ou célula, se fixam a essas estruturas e liberam seu conteúdo (CINTRA E SILVA et al., 2012).

Uma emulsão em sentidos gerais, é um sistema constituído de duas fases líquidas imiscíveis, uma das quais encontra-se dispersa no meio da outra na forma de finas gotículas (ALLEN JR; POPOVICH; ANSEL, 2007). Emulsões farmacêuticas usualmente consistem em água e um óleo. Podendo existir dois tipos principais: óleo-em-água (O/A) e água-em-óleo (A/O), dependendo de a fase contínua ser aquosa ou oleosa, onde fase contínua se define como a fase em que as gotículas se encontram dispersas/suspensas. Existem sistemas mais complexos de emulsões, como por exemplo, uma gotícula óleo envolvendo como uma gotícula de água suspensa em água para formar uma emulsão (A/O/A), outros correspondentes como (O/A/O) são chamados de emulsões múltiplas e apresentam interesses como sistemas de liberação mais específicos como liberação e ação retardada de fármacos. Com isso, é possível a formulação ser conjunta de medicamentos lipossolúveis e hidrossolúveis, onde estes podem ser absorvidos de maneiras mais fáceis em condições divididas das substâncias emulsificadas (AULTON, 2005).

As dispersões de gotículas em nano escala, são referenciadas na literatura como miniemulsões, emulsões ultrafinas, microemulsões instáveis ou submicro emulsões (CAPEK, 2004; FERNANDEZ et al., 2004; PEY et al., 2006; SHAH; BHALODIA; SHELAT, 2010). Em geral, podem ser preparadas por polimerizações, sínteses com polímeros pré-formados, entre outras maneiras (ROSSI et al., 2008) e sua mais fundamental característica para uma futura aplicação, é o tamanho, convencionado entre 1 a 100 nm (CHIESA et al., 2008).

Interessante ressaltar que em termos técnicos existe a diferença entre as microemulsões e nanoemulsões, desde seu prefixo, já que o termo “micro” significa 10^{-6} , enquanto o termo “nano” significa 10^{-9} , o que implicaria que as nanoemulsões apresentariam gotículas que são menores do que aquelas em microemulsões. Porém na prática, pode ter casos em que acaba sendo o contrário, devido a terminologia ser derivada de um desenvolvimento histórico da área onde o termo “microemulsão” foi publicado em 1961, porém o primeiro artigo que usa o termo “nanoemulsão” é datado de 1996, sendo assim o primeiro se tornado mais estabelecido entre os pesquisadores do que o segundo (MCCLEMENTS, 2012). Sua estrutura é outra característica, que pode ser núcleo líquido, matriz polimérica e com a substância ativa na dispersão (FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P., 1988). Todas as estratégias visam uma maior eficiência no transporte do fármaco, no caso, e da proteção do mesmo no organismo, contra pH, luz e diminuição da irritação nos tecidos.

Métodos utilizados para preparar nanoemulsões podem ser classificados em dois tipos principais. Os métodos de alta energia fazem uso de dispositivos mecânicos, como micro fluidificadores, ultrassonificadores e homogeneizadores de alta pressão, para criar forças

capazes de romper e misturar as fases de óleo e água para que pequenas gotículas sejam formadas. Quase qualquer óleo pode ser submetido a nanoemulsificação usando esses métodos, porém pode apresentar desvantagens: alto custo instrumental, muitas vezes utiliza de altas temperaturas operacionais que podem atrapalhar com a utilização de alguns compostos, entre outros.

Os métodos de baixa energia são mais práticos em termos energéticos, pois apenas uma simples agitação acaba sendo necessária. Uma característica especial desses métodos é a utilização da energia armazenada no sistema para produzir gotas ultrafinas. Os métodos de baixa energia desviam as propriedades físico-químicas intrínsecas dos tensoativos, co-tensoativos e excipientes na formulação, levando à geração de gotículas de emulsão na faixa nanométrica (ANTON; VANDAMME, 2009). Métodos de baixa energia incluem emulsificação espontânea e métodos de inversão de fase, onde vai ser essa segunda que vai se baseado esse estudo.

A técnica de Temperatura de Inversão de Fase (TIF, do inglês PIT, *Phase Inversion Temperature*), utiliza da base de Shinoda e Arai que propuseram na década de 60 que o comportamento de fase e propriedades da emulsão é dependente da temperatura, o que possibilitou definir quando ocorre a inversão de uma emulsão óleo/água para uma água/óleo e vice-versa (MACIEL, 2012; RODRIGUES et al., 2018), além de apresentar uma nano emulsificação de baixa energia, se beneficiando da tensão interfacial desprezível, alcançada com essa mudança de temperatura (RODRIGUES et al., 2018b; SHINODA; ARAI, 1964).

Assim, no método as transições de fase são desencadeadas por mudanças na temperatura, ocorrendo a emulsificação devido às mudanças na solubilidade/afinidade do tensoativo para a fase aquosa, envolvendo uma conversão ordenada de emulsão A/O para O/A ou vice-versa através de uma fase bi contínua intermediária. Este método só pode ser aplicado aos sistemas que possuem tensoativos sensíveis a mudanças de temperatura, como tensoativos não iônicos, que sofrem alterações na hidratação de suas cadeias de polioxietileno (POE) devido a mudanças na temperatura do sistema, resultando na inversão de sua curvatura e formação de emulsão (REHMAN et al., 2019; SINGH et al., 2017b).

É importante ressaltar que o tensoativo vai se comportar como hidrofílico em temperatura abaixo da temperatura de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB) e como hidrofóbico acima dessa temperatura, com valor nessa escala próximo de 12, propiciando a formação da emulsão O/A. A primeira etapa do procedimento parte da preparação de uma emulsão em sua temperatura de inversão de fase (também chamada HLB). Embora a formação de gotículas muito pequenas seja favorecida nessa temperatura, a curvatura espontânea do tensoativo é quase

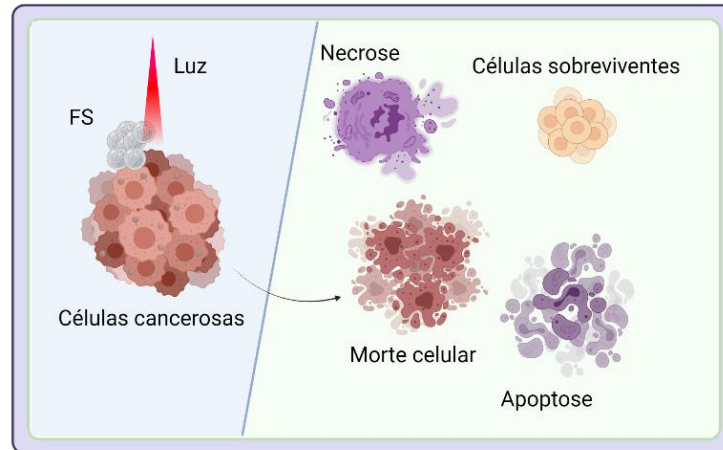
zero, tendo uma alta taxa de coalescência (que é a junção ou fusão dos elementos para formar uma massa ou um todo). Por isso, as emulsões formadas por microemulsão bi contínua são muito instáveis em sua primeira etapa de preparo (ICI AMERICAS, 1984). Na segunda etapa, o sistema é resfriado ou aquecido rapidamente, o que causa a inversão de fase, resultando na formação de emulsões O/A ou A/O cineticamente estáveis, respectivamente. O processo de resfriamento ou aquecimento deve ser muito rápido; caso contrário, as nanoemulsões polidispersas são formadas devido à coalescência predominante. Um dos principais pontos negativos associados a esse método de preparo é que os fármacos, termo sensíveis, acabam sendo evitados, para sua não degradação. (REHMAN et al., 2019).

1.7. Terapia Fotodinâmica (TFD)

Os fotoprocessos, de uma maneira geral, junto com a Terapia Fotodinâmica (TFD), já estão consolidadas no mundo, como uma forma alternativa e coadjuvante no tratamento de cânceres, considerando-se os avanços obtidos nestes últimos 40 anos de pesquisa. (BRESLIN; O'DRISCOLL, 2013; CHEN et al., 2015) Compreende uma terapêutica minimamente invasiva que pode exercer atividade citotóxica seletiva para células cancerosas (LIM et al., 2013; SANTOS, 2020). Esta terapia pode atuar de forma coadjuvante e auxiliar em casos de gliomas, não atendidas ou de difícil acesso por procedimentos clássicos (AGOSTINIS et al., 2011; VAN STRATEN et al., 2017).

A TFD é um tratamento utilizado principalmente na terapia antitumoral, baseando-se na interação da luz, oxigênio intracelular e um fármaco fotossensibilizante (FS) (de origem sintética ou natural) que pode se acumular seletivamente em tecidos tumorais (DOLMANS; FUKUMURA; JAIN, 2003; VASILEV et al., 2020). Sob a aplicação de luz visível num comprimento de onda que corresponde à absorção máxima do FS e na presença do oxigênio molecular intracelulares, após uma cascata de eventos, levam a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO / ROS) induzindo processos de morte celular por necrose ou apoptose (Chen et al., 2015). Um esquema simplificado de como as células tumorais respondem à aplicação da TFD está representado na **Figura 3**.

Figura 3 - Resposta imunológica produzida pela terapia fotodinâmica (TFD) após irradiação de luz sobre a célula de câncer tratada com fotossensibilizador (FS), ocorrendo a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs).



Fonte 3: Adaptado (AGOSTINIS et al., 2011).

Desde os anos 2000, em virtude dos estudos envolvendo processos luminosos e engenharia tecidual, essa abordagem vem lentamente ganhando espaço no mundo científico, onde os fotoprocessos passaram a ser estudados e usados não só no tratamento, mas na fotobiomodulação sobre a resposta celular. Os fotoprocessos associados a engenharia tecidual têm permitido avanços fantásticos com respostas celulares, abrangendo o reparo de tecidos (como nas lesões cicatriciais), o tratamento de queimaduras, diabetes, reparação óssea bem como outras patologias cutâneas superficiais, atuando também nos processos de morte celular por vias clássicas como apoptose, necrose ou autofagia. (JIANG et al., 2021; QIAO et al., 2022).

1.8. Os fármacos fotossensibilizantes

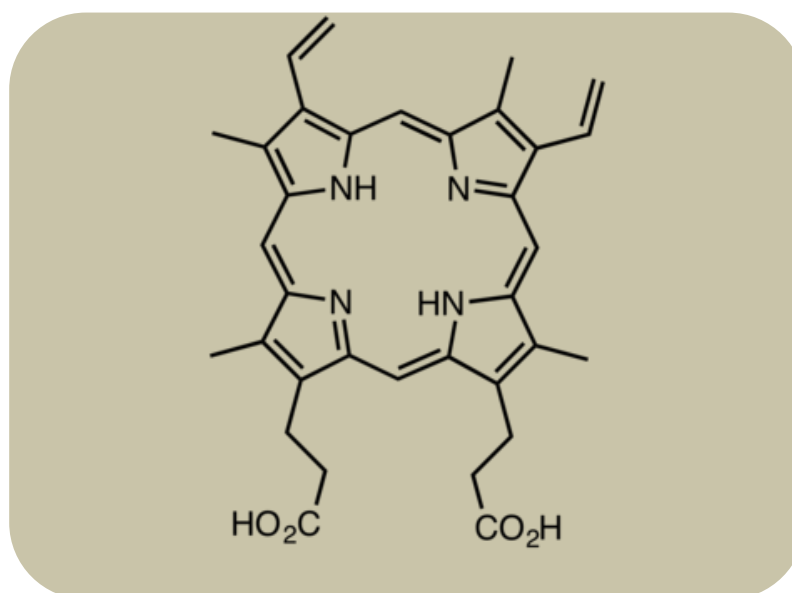
A nanotecnologia aplicada à área farmacêutica permite o desenvolvimento de formulações à base de compostos biocompatíveis e biodegradáveis para aplicação como novos agentes antitumorais. Exemplos que apresentam esse potencial terapêutico e serão analisados nesse estudo são o Canabidiol (CBD), a indocianina verde (ICG) e a protoporfirina IX (PpIX).

1.8.1. A protoporfirina

As porfirinas, cuja estrutura molecular está representada na **Figura 4** abaixo, são uma classe de tetra pirróis a qual têm chamado a atenção de pesquisadores devido à sua extensa

aplicação como fármaco fotossensibilizante na medicina. Em específico a protoporfirina IX (PpIX) é um constituinte porfirínico natural da hemoglobina, citocromo e outras moléculas biologicamente relevantes. A PpIX classificada como um fotossensibilizador de segunda geração, é produzido no organismo pela conversão do ácido 5-aminolevulínico através da via biossintética do heme (BATTLE, 2017; XIAO et al., 2002). A PpIX apresenta uma elevada absorção de luz visível (próximo de 505 nm) e têm propriedades fotofísicas bem definidas, sendo utilizada como FS, emitindo uma forte fluorescência (entre 600 a 800 nm) e foto branqueando rapidamente, com a produção de oxigênio singlete. Em estudos direcionados na literatura foi demonstrado que a PpIX é foto degradada por um processo de foto-oxidação e que seus foto produtos também possuem uma banda de absorção característica em torno de 630 nm (ERICSON et al., 2003).

Figura 4 - Estrutura da Protoporfirina IX.



Fonte 4: Autoria própria.

Algumas propriedades desse composto acabam limitando seu uso direto como FS na TFD, como sua solubilidade baixa em meio fisiológico e a tendência de agregação em solução aquosa, também dificultando sua administração sistêmica, reduzindo a ação fotodinâmica (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004; DA SILVA et al., 2013; ROSSI et al., 2008). Baseado nestes fatos o uso de um sistema nanoestruturado para encapsulamento e veiculação do mesmo, se faz necessário, como já é observado na literatura, envolvendo nano formulações e as nanopartículas lipídicas poliméricas (E. FATTAL, C. VAUTHIER; J. SWARBRICK, 2002).

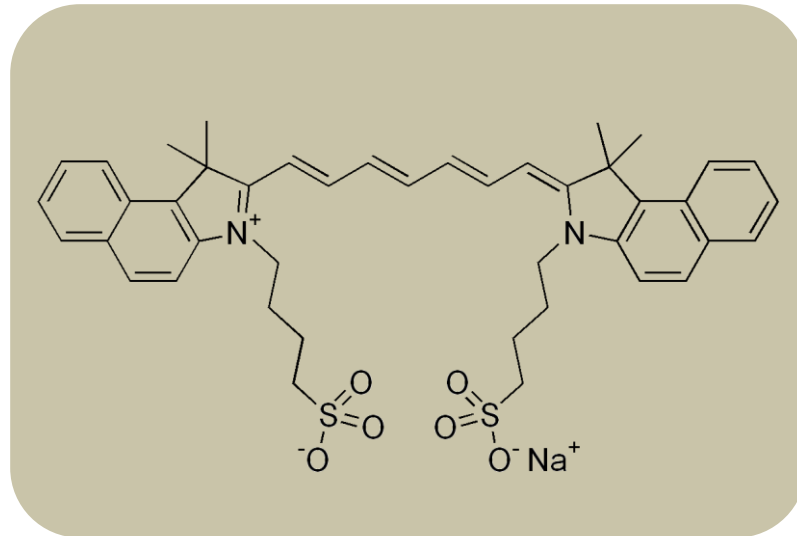
1.8.2. Indocianina Verde

Indocianina verde (ICG, do inglês *Indocyanine Green*) (**Figura 5**), um corante característico com utilização na região do infravermelho próximo (NIR – do inglês *Near InfraRed*), foi inicialmente descrito em meados da segunda guerra como corante, depois clinicamente aprovado, por pesquisas para testes de função hepática e angiografia de fluorescência em oftalmologia, além de ser investigado como um potencial agente de contraste para a detecção de tumores em ambos os modelos: animais e em humanos (LICHA et al., 2000). Ntziachristos et al. (2000), demonstraram a detecção de tumores de mama em humanos por tomografia óptica usando o ICG como agente de contraste é viável e se correlaciona com a distribuição do ácido dietilenotriamina pentacético gadolínio (Gd-DTPA) obtido por ressonância magnética (NTZIACHRISTOS et al., 2000).

No entanto, devido à forte ligação às proteínas plasmáticas do ICG, sua rápida depuração pelo fígado (MEIJER; WEERT; VERMEER, 1988), suas propriedades de localização e acúmulo preferencial em sistemas tumorais, é possível seu uso em estudos e diagnósticos de gliomas (MATSUMURA Y, 1986). Porém, a ICG apresenta limitações a um período bastante curto de interação após a administração, associação intermolecular promove conversão interna não radiativa, levando a uma diminuição no tempo de vida do tripleto excitado e a uma redução na eficiência geral de fotossensibilização, especialmente para a detecção de tecidos profundos (>1 cm), sugerindo assim a necessidade de compostos ou estruturas de administração melhoradas.

Ultimamente, as características de imagem/biológicas são os pontos favoráveis do ICG como um fluoróforo no infravermelho próximo (do inglês NIR – Near Infrared), usada na investigação da oxigenação periférica tecidual de forma não invasiva, mantendo o interesse em sua incorporação em nanopartículas para a formação de ferramentas teranósticas de câncer (TENG et al., 2021). Porém, tendo em mente que a estabilidade insuficiente de soluções aquosas, acompanhada por eficiência de fluorescência bastante pobre, são relatadas para o ICG (LANDSMAN et al., 1976; WEBER; BEARD; BOHNDIEK, 2016).

Figura 5 - Estrutura da Indocianina Verde.



Fonte 5: Autoria própria.

1.9. O canabidiol (CBD) e suas contribuições

O CBD nas últimas décadas tornou-se um centro de atenções e de pesquisa (CHERKASOVA et al., 2022), com sua estrutura química apresentada na **Figura 6**. Relata-se que o CBD pode ser usado não apenas como paliativo para sintomas relacionados ao câncer (como náusea, dores ou anorexia), mas também por promovem a morte celular apoptótica, prejudicando a angiogênese tumoral, além de reduzir a migração celular (FOWLER, 2015; VELASCO et al., 2016).

Os canabinóides são terpenofenóis farmacologicamente ativos que podem ser isolados ou obtidos ou oriundos de três grandes grupos:

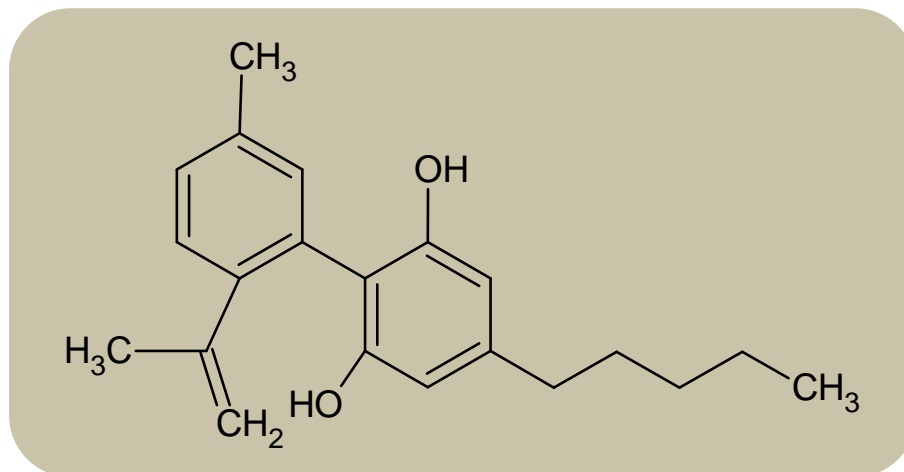
- Fitocanabinóides: produzidos pela tricoma, uma glândula da planta herbácea *Cannabis sativa*;
- Endocanabinóides: produzidos naturalmente por animais e humanos em um sistema endocanabinoide (APARICIO-BLANCO et al., 2019), ele consiste nos receptores CB1, localizados no sistema nervoso, tecidos conectivos, gônadas, glândulas e órgãos;
- Receptores CB2: encontrados principalmente no sistema imunológico e em outros órgãos; esses receptores agem como mensageiros cerebrais retrógrados.

O Primeiro estudo descrevendo suas propriedades antineoplásicas foi publicado em (MUNSON et al., 1975) e recentemente, os canabinóides associados a propriedades antitumorais incluem: canabinol (CBN), Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC), Δ^8 -THC, canabidiol (CBD) e canabicitol (CBL) (RAZLOG; KRUGER; ABRAHAMSE, 2022).

De acordo com estudos de tratamento de câncer cervical - *in vitro* realizados por (EICHELE; RAMER; HINZ, 2009; FREIMUTH; RAMER; HINZ, 2010; LUKHELE; MOTADI, 2016; RAMER; HINZ, 2008) observou-se que o CBD é capaz de ativar respostas imunes específicas, o que pode auxiliar no tratamento primário, bem como secundário do câncer cervical, pois pode atenuar sua metástase e disseminação secundária (CONTASSOT et al., 2004).

O estímulo começa no neurônio pós-sináptico e a excitação neuronal leva à despolarização e ao influxo de íons cálcio que estimulam várias fosfolipases, iniciando assim a síntese dos endocanabinóides) (GODOY-MATOS et al., 2006), e canabidomiméticos sintéticos. Contudo, o potencial terapêutico dos canabinóides têm sido limitados devido sua influência em efeitos psicoativos e sua lipofilicidade (BIENENSTOCK, 2016; JOUR et al., 2019). Parte do desenvolvimento de pesquisas neste campo emergente é impulsionado pelos avanços na nanotecnologia, que permitiram a síntese de nanopartículas.

Figura 6 - Estrutura do Canabidiol (CBD).



Fonte 6: Autoria própria.

2. Objetivos:

2.1. Objetivos gerais

O estudo propõe-se desenvolver e caracterizar uma nanoemulsão como base na metodologia de temperatura de inversão de fase (TIF), como sistema de liberação, contendo os fármacos fotossensibilizadores derivados da Indocianina verde e do protoporfirina IX, associados ao Canabidiol para o tratamento de glioblastomas, coadjuvante aos tratamentos clássicos e com a Terapia Fotodinâmica (TFD).

2.2. Objetivos específicos:

- Padronização da produção de sistemas 3D esféricos com células de glioblastoma U87MG e T98G utilizando levitação magnética;
- Desenvolvimento e otimização da metodologia de produção das nanoemulsões multi-carregadas, contendo Canabidiol e os Fotossensibilizadores ICG e PpIX;
- Estudos Físico-químicos de caracterização dos sistemas nanoemulsionados;
- Avaliação da viabilidade, proliferação celular e invasão celular na presença e ausência do tratamento com as nanoemulsões multi-carregadas;
- Estudos *in vitro* do efeito fotodinâmico em relação às células de glioblastoma (U87MG e T98G) na presença e ausência do tratamento com as nanoemulsões multi-carregadas.

3. Conclusões:

Neste estudo foram desenvolvidos e caracterizados as nanoemulsões por meio da metodologia de temperatura de inversão de fase (TIF) na presença de ativos e fotoativos como Canabidiol, Indocianina Verde (ICG) e Protoporfirina IX (PpIX).

Todos os resultados indicaram que as mesmas são estáveis, com um bom tempo de estocagem e facilmente escalonável, propriedades imprescindíveis para o desenvolvimento de novos medicamentos, a ativos multi-carregadas. As microscopias de transmissão (MET) indicaram uma morfologia esférica. Além de 88,89 % ($\pm 5,5$ %) de taxa de incorporação em média. Todas as propriedades físico-químicas avaliadas estavam dentro do esperado para um sistema nanoestruturado para veiculação de fármacos.

A acumulação intracelular, após 2h de incubação, se mostrou apropriada para os estudos subsequentes. As nanoemulsões NE-CC Vazia e NE-CC P.I.C. não apresentaram citotoxicidade significativa em nenhuma das linhagens celulares estudadas, indicando que os efeitos de toxicidade são exclusivos das interações resultantes da geração de espécies reativas de oxigênio, quando esses ativos são irradiados. Os valores para estas linhagens celulares exibiram uma maior fototoxicidade para a linhagem U87MG, na ordem de 20 % mais fototóxica, quando comparada com a T98G, em ambos os lasers. Pôde-se concluir que as duas linhagens celulares demonstraram diferenças estatísticas em relação aos controles desde a dose de 50 mJ/cm², sendo observado fototoxicidades na ordem de 65 a 85 %. Diferenças significativas também foram obtidos na relação entre os estudos em monocamada e os estudos tridimensionais, onde a viabilidade foi maior no segundo estudo, atribuído à estrutura tridimensional do cultivo, impedindo, por exemplo, que a incidência chegue nas camadas mais profundas.

Levando em consideração os resultados obtidos neste estudo é possível inferir que as concentrações dos três ativos foram válidas para obter o efeito fototóxico nas linhagens celulares, mostrando diferenças estatísticas entre os estudos com esferóides, sendo útil para compreender melhor a interação das células com os compostos. Portanto, a nanoemulsão com as incorporações dos ativos pôde ser empregada e estudada para aplicação em Terapia Fotodinâmica e localização dos gliomas, ajudando nas características dos sinais, principalmente visando que este protocolo seja adaptado para futuros estudos fotobiológicos *in vitro* e *in vivo*, com doses maiores e fototoxicidade maiores são esperadas.

4. Referência:

ADEPU, S.; RAMAKRISHNA, S. Controlled Drug Delivery Systems: Current Status and Future Directions. *Molecules*, v. 26, n. 19, 1 out. 2021.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**. Disponível em: <RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017>. Acesso em: 13 ago. 2023.

AGOSTINIS, P. et al. PHOTODYNAMIC THERAPY OF CANCER: AN UPDATE. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 61, n. 4, p. 250, jul. 2011.

AGUILAR COSME, J. R. et al. In Vitro Low-Fluence Photodynamic Therapy Parameter Screening Using 3D Tumor Spheroids Shows that Fractionated Light Treatments Enhance Phototoxicity. *ACS Biomaterials Science and Engineering*, v. 7, n. 11, p. 5078–5089, 8 nov. 2021.

ALI NESHASTEHRIZ; ROZHIN RAHDANI;; AHMAD MOSTAAR. Evaluation of The Combined Effects of Hyperthermia, Cobalt-60 Gamma Rays and IUDR on Cultured Glioblastoma Spheroid Cells and Dosimetry Using TLD-100 - PubMed. *Cell J .* , 4 out. 2014.

ALLEN JR, L. V.; POPOVICH, N. G.; ANSEL, H. C. Formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. p. 776–776, 2007.

ANTON, N.; VANDAMME, T. F. The universality of low-energy nano-emulsification. *International journal of pharmaceutics*, v. 377, n. 1–2, p. 142–147, 30 jul. 2009.

APARICIO-BLANCO, J. et al. Lipid nanocapsules decorated and loaded with cannabidiol as targeted prolonged release carriers for glioma therapy: In vitro screening of critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 134, p. 126–137, 1 jan. 2019a.

APARICIO-BLANCO, J. et al. Lipid nanocapsules decorated and loaded with cannabidiol as targeted prolonged release carriers for glioma therapy: In vitro screening of critical parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 134, p. 126–137, 1 jan. 2019b.

ARTHUR ORLANDO CORRÊA SCHLITZ. **Estimativa 2020 incidência de câncer no brasil**.

AULTON, M. E. **Delineamento de formas farmacêuticas. - 2. ed. / 2005 - Livros. 2. ed. [s.l: s.n.].**

AZMI, N. A. N. et al. Preparation, Characterization and Biological Activities of an Oil-in-Water Nanoemulsion from Fish By-Products and Lemon Oil by Ultrasonication Method. **Molecules**, v. 27, n. 19, p. 6725, 9 out. 2022.

BAE, P. K.; JUNG, J.; CHUNG, B. H. Highly enhanced optical properties of indocyanine green/perfluorocarbon nanoemulsions for efficient lymph node mapping using near-infrared and magnetic resonance imaging. 2014.

BARTH, B. M. et al. Targeted Indocyanine-Green-Loaded Calcium Phosphosilicate Nanoparticles for In Vivo Photodynamic Therapy of Leukemia. 2011.

BATTLE, A. AND Q. P. Preface: special issue of photodynamic therapy and photodetection with porphyrin precursors for the journal of environmental pathology, toxicology, and oncology. 2017.

BAUMERT, B. G. et al. Temozolomide chemotherapy versus radiotherapy in high-risk low-grade glioma (EORTC 22033-26033): a randomised, open-label, phase 3 intergroup study. **The Lancet. Oncology**, v. 17, n. 11, p. 1521–1532, 1 nov. 2016.

BHALEKAR, M. R. et al. Anti-rheumatic activity of chloroquine-SLN gel on wistar rats using complete freund's adjuvant (CFA) model. **Indian Journal of Rheumatology**, v. 10, n. 2, p. 58–64, jun. 2015.

BIENENSTOCK, D. **Como (e por que) seu cérebro produz seus próprios canabinoides**. Disponível em: <https://www.vice.com/pt_br/article/ezg84e/como-e-por-que-seu-cerebro-produz-seus-proprios-canabinoides>.

BLAKELEY, J. Drug delivery to brain tumors. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, v. 8, n. 3, p. 235–241, 29 maio 2008.

BLEEKER, F. E.; MOLENAAR, R. J.; LEENSTRA, S. Recent advances in the molecular understanding of glioblastoma. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 108, n. 1, p. 11, maio 2012.

BOR-SENG-SHU SÃO PAULO, E. MARCELO DE LIMA OLIVEIRA Ultrassonografia durante cirurgia para metástase cerebral: influência no índice de Karnofsky e volume do tumor residual. 2016.

BRESLIN, S.; O'DRISCOLL, L. Three-dimensional cell culture: the missing link in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 18, n. 5–6, p. 240–249, mar. 2013.

BRYANT, S. J.; NUTTELMAN, C. R.; ANSETH, K. S. Cytocompatibility of UV and visible light photoinitiating systems on cultured NIH/3T3 fibroblasts in vitro. <http://dx.doi.org/10.1163/156856200743805>, v. 11, n. 5, p. 439–457, 1 jan. 2012.

CADDEO, C. et al. Nanocarriers for antioxidant resveratrol: Formulation approach, vesicle self-assembly and stability evaluation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 111, p. 327–332, 1 nov. 2013.

CAPEK, I. Degradation of kinetically-stable o/w emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 107, n. 2–3, p. 125–155, 19 mar. 2004.

CARVALHO, K. V. **Desenvolvimento e avaliação de nanoemulsões com extrato etanólico bruto das folhas de Melaleuca leucadendron e cloridrato de Pilocarpina para o uso potencial como radioprotetor tópico.** [s.l.] Universidade Federal de Ouro Preto, 2014.

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

CHEN, Y.-C. et al. High-Throughput Cancer Cell Sphere Formation for Characterizing the Efficacy of Photo Dynamic Therapy in 3D Cell Cultures. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p. 12175, 8 dez. 2015.

CHERKASOVA, V. et al. Use of Cannabis and Cannabinoids for Treatment of Cancer. **Cancers**, v. 14, n. 20, 1 out. 2022.

CHIESA, M. et al. Thermal conductivity and viscosity of water-in-oil nanoemulsions. **Physicochem. Eng. Aspects**, v. 326, p. 67–72, 2008.

CHO, S. S.; SALINAS, R.; LEE, J. Y. K. Indocyanine-Green for Fluorescence-Guided Surgery of Brain Tumors: Evidence, Techniques, and Practical Experience. **Frontiers in Surgery**, v. 6, p. 11, 12 mar. 2019.

ÇINAR, K. A REVIEW ON NANOEMULSIONS: PREPARATION METHODS AND STABILITY. **Trakya University Journal of Engineering Sciences**, v. 18, n. 1, p. 73–83, 2017.

CINTRA E SILVA, D. D. O. et al. Successful strategy for targeting the central nervous system using magnetic albumin nanospheres. **Journal of biomedical nanotechnology**, v. 8, n. 1, p. 182–189, 2012.

COMMITTEE, A. M. (A. M. C.). Is my calibration linear? **Analyst**, v. 119, n. 11, p. 2363–2366, 1 jan. 1994.

CONTASSOT, E. et al. Arachidonylethanolamide Induces Apoptosis of Human Glioma Cells through Vanilloid Receptor-1. **Journal of Neuropathology & Experimental Neurology**, v. 63, n. 9, p. 956–963, 1 set. 2004.

DA SILVA, C. L. et al. Improved In vitro and In vivo Cutaneous Delivery of Protoporphyrin IX from PLGA-based Nanoparticles. **Photochemistry and Photobiology**, v. 89, n. 5, p. 1176–1184, set. 2013.

DAS, A.; BANIK, N. L.; RAY, S. K. Garlic compounds generate reactive oxygen species leading to activation of stress kinases and cysteine proteases for apoptosis in human glioblastoma T98G and U87MG cells. **Cancer**, v. 110, n. 5, p. 1083–1095, 1 set. 2007.

DAS, S. et al. Formulation design, preparation and physicochemical characterizations of solid lipid nanoparticles containing a hydrophobic drug: Effects of process variables. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 88, n. 1, p. 483–489, 1 nov. 2011.

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, n. 2, p. 271–277, 22 maio 1986.

DETLOFF, T.; SOBISCH, T.; LERCHE, D. Particle Size Distribution by Space or Time Dependent Extinction Profiles obtained by Analytical Centrifugation. **Particle & Particle Systems Characterization**, v. 23, n. 2, p. 184–187, 1 ago. 2006.

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, n. 1–2, p. 50–55, 16 maio 2007.

DEVALAPALLY, H.; CHAKILAM, A.; AMIJI, M. M. Role of nanotechnology in pharmaceutical product development. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, n. 10, p. 2547–2565, 1 out. 2007.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013a.

DIMER, F. A. et al. Impactos da nanotecnologia na saúde: produção de medicamentos. **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1520–1526, 2013b.

DOLMANS, D. E. J. G. J.; FUKUMURA, D.; JAIN, R. K. Photodynamic therapy for cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 3, n. 5, p. 380–387, maio 2003.

DORSEY JF, S. R. D. M. ET AL. About Brain and Spinal Cord Tumors in Adults What Are Adult Brain and Spinal Cord Tumors? **Chapter 63: Cancer of the central nervous system.**, v. 6th ed., n. Abeloff's Clinical Oncology., 2020.

DYRNA, F. et al. The blood-brain barrier. **Journal of Neuroimmune Pharmacology**, v. 8, n. 4, p. 763–773, 6 set. 2013.

E. FATTAL, C. VAUTHIER; J. SWARBRICK, J. C. B. (EDS.). Nanoparticles as drug delivery systems. **Encyclopedia of Pharmaceutical Technology**, p. 1864–1882, 2002.

EICHELE, K.; RAMER, R.; HINZ, B. R(+)-methanandamide-induced apoptosis of human cervical carcinoma cells involves a cyclooxygenase-2-dependent pathway. **Pharmaceutical research**, v. 26, n. 2, p. 346–355, fev. 2009.

EKONOMOU, S. I. et al. Development of Geraniol-Loaded Liposomal Nanoformulations against Salmonella Colonization in the Pig Gut. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 70, n. 23, p. 7004, 6 jun. 2022.

ERICSON, M. B. et al. A spectroscopic study of the photobleaching of protoporphyrin IX in solution. **Lasers in Medical Science**, v. 18, n. 1, p. 56–62, 2003.

F, D.; R, L. 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, n. 2, p. 271–277, 22 maio 1986.

FANG, Y.; EGLIN, R. M. Three-Dimensional Cell Cultures in Drug Discovery and Development. **SLAS Discovery**, v. 22, n. 5, p. 456–472, 1 jun. 2017.

FENNEMA, E. et al. Spheroid culture as a tool for creating 3D complex tissues. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 2, p. 108–115, fev. 2013.

FERLAY, J. et al. Cancer statistics for the year 2020: An overview. **International journal of cancer**, v. 149, n. 4, p. 778–789, 15 ago. 2021.

FERLAY J, S. I. E. M. D. R. E. S. M. C. R. M. P. D. F. D. B. F. **Câncer GLOBOCAN 2012: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012 v1.0.**

FERNANDEZ, P. et al. Nano-emulsion formation by emulsion phase inversion. **Physicochem. Eng. Aspects**, v. 251, p. 53–58, 2004.

FESSI, H., PUISIEUX, F., DEVISSAGUET, J.P. Procédé de préparation de systèmes colloïdaux dispersibles d'une substance, sous forme de nanocapsules. 1988.

FOWLER, C. Delta 9 -tetrahydrocannabinol and cannabidiol as potential curative agents for cancer: A critical examination of the preclinical literature. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 97, n. 6, p. 587–596, jun. 2015.

FRANZOL, A.; REZENDE, M. C. Estabilidade de emulsões: um estudo de caso envolvendo emulsionantes aniônico, catiônico e não-iônico. **Polimeros**, v. 25, p. 1–9, 1 dez. 2015.

FREIMUTH, N.; RAMER, R.; HINZ, B. Antitumorigenic Effects of Cannabinoids beyond Apoptosis. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 332, n. 2, p. 336–344, 1 fev. 2010.

FRESHNEY, R. I. **Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2015.

FRIBERG, S. E.; CORKERY, R. W.; BLUTE, I. A. Phase inversion temperature (PIT) emulsification process. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 56, n. 12, p. 4282–4290, 8 dez. 2011.

GODOY-MATOS, A. F. DE et al. O sistema endocanabinóide: novo paradigma no tratamento da síndrome metabólica. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 50, n. 2, p. 390–399, abr. 2006.

GOLDBERG, J. E.; SHERWOOD, S. W.; CLAYBERGER, C. A novel method for measuring CTL and NK cell-mediated cytotoxicity using annexin V and two-color flow cytometry. **Journal of Immunological Methods**, v. 224, n. 1–2, p. 1–9, abr. 1999.

GOMES, A. J. et al. Indocyanine green nanoparticles useful for photomedicine. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 24, n. 4, p. 514–521, ago. 2006.

GOMES, G. V. DE LARA. **Produção por métodos da temperatura de inversão de fases, estudo de estabilidade físico-química, digestibilidade in vitro e citotoxicidade de nanopartículas lipídicas sólidas encapsando beta-caroteno.** [s.l.] aculdade de zootecnia e engenharia de alimentos - universidade de são paulo. Pirassununga., 2015.

GONZÁLEZ, A. G. et al. The correlation coefficient attacks again. **Accreditation and Quality Assurance**, v. 11, n. 5, p. 256–258, jun. 2006.

GOSTYŃSKA, A. et al. Honokiol-Loaded Nanoemulsion for Glioblastoma Treatment: Statistical Optimization, Physicochemical Characterization, and an In Vitro Toxicity Assay. **Pharmaceutics 2023, Vol. 15, Page 448**, v. 15, n. 2, p. 448, 29 jan. 2023.

HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–1949, out. 2013a.

HAISLER, W. L. et al. Three-dimensional cell culturing by magnetic levitation. **Nature Protocols**, v. 8, n. 10, p. 1940–1949, 12 out. 2013b.

HAZEKAMP, A. et al. Chromatographic and Spectroscopic Data of Cannabinoids from *Cannabis sativa* L. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 28, n. 15, p. 2361–2382, 2005.

HERNAN PEREZ DE LA OSSA, D. et al. Poly- ϵ -caprolactone microspheres as a drug delivery system for cannabinoid administration: Development, characterization and in vitro evaluation of their antitumoral efficacy. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 927–932, 10 ago. 2012.

HEURTAULT, B. et al. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, n. 23, p. 4283–4300, 1 out. 2003.

HOU, Z. et al. Investigation into the physicochemical stability and rheological properties of β -carotene emulsion stabilized by soybean soluble polysaccharides and chitosan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 15, p. 8604–8611, 11 ago. 2010.

HUSE, J. T.; HOLLAND, E. C. Targeting brain cancer: advances in the molecular pathology of malignant glioma and medulloblastoma. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 5, p. 319–331, maio 2010.

ICI AMERICAS, INC. **The HLB System: A Time-saving Guide to Emulsifier Selection**. [s.l.: s.n.].

JIANG, T. et al. Characterization of evolution trajectory and immune profiling of brain metastasis in lung adenocarcinoma. **npj Precision Oncology**, v. 5, n. 1, p. 6, 12 fev. 2021.

JIGISHA P THAKKAR; PIER PAOLO PERUZZI; VIKRAM C PRABHU. **Glioblastoma Multifforme**. Disponível em: <<https://www.aans.org/en/Patients/Neurosurgical-Conditions-and-Treatments/Glioblastoma-Multifforme>>. Acesso em: 2 jan. 2023.

JOHARI, O. Comparison of Transmission Electron Microscopy and Scanning Electron Microscopy of Fracture Surfaces. **JOM** **1968** **20:6**, v. 20, n. 6, p. 26–32, 12 jan. 2017.

JOUR, T.- et al. Nannocannabinoids for brain tumor drug. **85, VL - Farmacia, JO - Anales de la Real Academia Nacional de -, ER**, p. 198, SP-216, EP- Delivery, T1-, 2019.

KHANAM, N. et al. Electrospun linear polyethyleneimine scaffolds for cell growth. **Acta Biomaterialia**, v. 3, n. 6, p. 1050–1059, 1 nov. 2007.

LAMBERT, A. W.; PATTABIRAMAN, D. R.; WEINBERG, R. A. Emerging Biological Principles of Metastasis. **Cell**, v. 168, n. 4, p. 670–691, 9 fev. 2017.

LANDSMAN, M. L. J. et al. Light-absorbing properties, stability, and spectral stabilization of indocyanine green. <https://doi.org/10.1152/jappl.1976.40.4.575>, v. 40, n. 4, p. 575–583, 1976.

LERCHE, D.; SOBISCH, T. Direct and Accelerated Characterization of Formulation Stability. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 32, n. 12, p. 1799–1811, dez. 2011.

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, jan. 2014.

LICHA, K. et al. Hydrophilic Cyanine Dyes as Contrast Agents for Near-infrared Tumor Imaging: Synthesis, Photophysical Properties and Spectroscopic In vivo Characterization¶. **Photochemistry and Photobiology**, v. 72, n. 3, p. 392, 2000.

LIM, C. K. et al. Nanophotosensitizers toward advanced photodynamic therapy of Cancer. **Cancer Letters**, v. 334, n. 2, p. 176–187, 1 jul. 2013.

LIN, M. H. C. et al. Photochemical Internalization of Etoposide Using Dendrimer Nanospheres Loaded with Etoposide and Protoporphyrin IX on a Glioblastoma Cell Line. **Pharmaceutics** **2021**, Vol. **13**, Page **1877**, v. 13, n. 11, p. 1877, 5 nov. 2021.

LIU, D.; CHEN, S.; WIN NAING, M. A review of manufacturing capabilities of cell spheroid generation technologies and future development. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 118, n. 2, p. 542–554, 17 fev. 2021.

LUKHELE, S. T.; MOTADI, L. R. Cannabidiol rather than Cannabis sativa extracts inhibit cell growth and induce apoptosis in cervical cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, 1 set. 2016.

MACIEL, N. R. **Desenvolvimento de emulsões múltiplas cométicas contendo óleo de girassol e óleo de gergelim: estudos de estabilidade físico-química**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2012.

MAGALHAES, W. L. ESTEVES. **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA**. Disponível em: <<https://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1104215&biblioteca=vazio&busca=1104215&qFacets=1104215&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>>. Acesso em: 22 mar. 2023.

MANMEET AHLUWALIA. **Glioblastoma (GBM)**. Disponível em: <https://www.abta.org/tumor_types/glioblastoma-gbm/>. Acesso em: 2 jan. 2023.

MARTINS, MARGARIDA. **INOVAÇÃO NO COMBATE A DOENÇAS NEUROLÓGICAS**. Disponível em: <<http://cienciahoje.org.br/inovacao-no-combate-a-doencas-neurologicas/>>.

MATSUMURA Y, M. H. A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumorotropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. 1986.

MCCLEMENTS, D. J. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft Matter**, v. 8, n. 6, p. 1719–1729, 18 jan. 2012.

MD, S. et al. Lipid based nanocarriers system for topical delivery of photosensitizers. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 8, p. 1274–1283, 1 ago. 2017.

MEIJER, D. K. F.; WEERT, B.; VERMEER, G. A. Pharmacokinetics of biliary excretion in man. VI. Indocyanine green. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 35, n. 3, p. 295–303, maio 1988.

MIKOLAJCZYK, A. et al. Zeta potential for metal oxide nanoparticles: A predictive model developed by a nano-quantitative structure-property relationship approach. **Chemistry of Materials**, v. 27, n. 7, p. 2400–2407, 14 abr. 2015.

MORA-HUERTAS, C. E.; FESSI, H.; ELAISSARI, A. Polymer-based nanocapsules for drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 385, n. 1–2, p. 113–142, jan. 2010.

MOURA, G. R. C. R. A. M. M. V. L. N. J. F. REIS. Determinação de figuras de mérito para a metodologia de análise de ferro total em água. **Anais da XIII Semana Nacional de Ciência e Tecnologia ICET/UFAM e IFAM**, 2019.

MUNIZ, C. A. DE S. **Novas Formulações de fluidos de corte: Otimização, propriedades e recuperação do óleo usado.** Disponível em: <<https://docplayer.com.br/61761625-Claudia-alves-de-sousa-muniz-novas-formulacoes-de-fluidos-de-corte-otimizacao-propriedades-e-recuperacao-do-oleo-usado.html>>. Acesso em: 22 jun. 2021.

MUNSON, A. E. et al. Antineoplastic Activity of Cannabinoids. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 55, n. 3, p. 597–602, 1 set. 1975.

NOMURA, D. A. et al. Espalhamento Dinâmico de Luz. 2017.

NTZIACHRISTOS, V. et al. Concurrent MRI and diffuse optical tomography of breast after indocyanine green enhancement. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 6, p. 2767–2772, 14 mar. 2000.

OBEROI, R. K. et al. Strategies to improve delivery of anticancer drugs across the blood–brain barrier to treat glioblastoma. **Neuro-Oncology**, v. 18, n. 1, p. 27–36, jan. 2016.

OLIVEIRA, I. M. DE;; ROSA, R. MOREIRA. **Introdução à regulação do pH do fluido extracelular.** Disponível em: <https://professor.ufrgs.br/sites/default/files/lucasalvares/files/poligrafo_3_-_tampoes_biologicos_-.pdf>. Acesso em: 13 mar. 2023.

PECORINO L. **Molecular biology of cancer: mechanisms, targets, and therapeutics.** Third Edition ed. [s.l.] Oxford university, 2012.

PECORINO, LAUREN. **Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics.** Fifth ed. [s.l.] Oxford University Press, 2021. v. 1

PEREIRA, G. G.; PRETO, R. **Obtenção de nanoemulsões O/A à base de óleo de semente de uva e oliva aditivadas de metoxicinamato de octila e estudo do potencial**

antioxidante e fotoprotetor das emulsões. Ribeirão Preto: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO, 2008.

PERRY, A.; WESSELING, P. Histologic classification of gliomas. **Handbook of Clinical Neurology**, v. 134, p. 71–95, 1 jan. 2016.

PEY, C. M. et al. Optimization of nano-emulsions prepared by low-energy emulsification methods at constant temperature using a factorial design study. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 288, n. 1–3, p. 144–150, 5 out. 2006.

PRZYBYLO, M. et al. The cellular internalization of liposome encapsulated protoporphyrin IX by HeLa cells. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 85, p. 39–46, 31 mar. 2016.

QIAN, J.; GHARIBI, A.; HE, S. Colloidal mesoporous silica nanoparticles with protoporphyrin IX encapsulated for photodynamic therapy. **Journal of Biomedical Optics**, v. 14, n. 1, p. 014012, 2009.

QIAO, L. et al. Research Progress on Nanoplatfoms and Nanotherapeutic Strategies in Treating Glioma. **Molecular Pharmaceutics**, v. 19, n. 7, p. 1927–1951, 4 jul. 2022.

RABINOVICH-GUILATT, L. et al. Extensive surface studies help to analyse zeta potential data: The case of cationic emulsions. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 131, n. 1, p. 1–13, 1 ago. 2004.

RACHMAWATI, H. et al. The In Vitro–In Vivo Safety Confirmation of PEG-40 Hydrogenated Castor Oil as a Surfactant for Oral Nanoemulsion Formulation. **Scientia Pharmaceutica**, v. 85, n. 2, p. 18, 31 mar. 2017.

RAHMAN, Z.; ZIDAN, A. S.; KHAN, M. A. Non-destructive methods of characterization of risperidone solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 76, n. 1, p. 127–137, 1 set. 2010.

RAMÃO, A. et al. Changes in the expression of proteins associated with aerobic glycolysis and cell migration are involved in tumorigenic ability of two glioma cell lines. **Proteome Science**, v. 10, p. 1, 2012.

RAMER, R.; HINZ, B. Inhibition of Cancer Cell Invasion by Cannabinoids via Increased Expression of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases-1. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 100, n. 1, p. 59–69, 2 jan. 2008.

RAMOS, T. M. Potencialidades da microscopia eletrônica (transmissão e varredura) e microscopia confocal como ferramentas para análises de amostras biológicas. 2013.

RAZLOG, R.; KRUGER, C. A.; ABRAHAMSE, H. Enhancement of Conventional and Photodynamic Therapy for Treatment of Cervical Cancer with Cannabidiol. **Integrative Cancer Therapies**, v. 21, p. 153473542210927, 28 jan. 2022.

REDDY, T. S.; ZOMER, R.; MANTRI, N. Nanoformulations as a strategy to overcome the delivery limitations of cannabinoids. **Phytotherapy Research**, 2023.

REHMAN, A. U. et al. Lipid nanocarriers: Formulation, properties, and applications. Em: **Smart Nanocontainers: Micro and Nano Technologies**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 355–382.

RETAMAL MARÍN, R. R. Characterization of Nanomaterials in Liquid Disperse Systems. Particle Technology Series. v. 28, 2022.

ROCHA, F. R. P.; TEIXEIRA, L. S. G. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807–812, 2004.

RODRIGUES, F. et al. PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF NANOEMULSION CONTAINING A NATURAL NAPHTHOQUINONE. **Química Nova**, 2018a.

RODRIGUES, F. V. S. et al. Preparation and characterization of nanoemulsion containing a natural naphthoquinone. **Química Nova**, v. 41, n. 7, p. 756–761, 1 jul. 2018b.

ROSSETTI, F. C. et al. Optimization of protoporphyrin IX skin delivery for topical photodynamic therapy: Nanodispersions of liquid-crystalline phase as nanocarriers. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, p. 99–108, 15 fev. 2016.

ROSSI, L. M. et al. Protoporphyrin IX Nanoparticle Carrier: Preparation, Optical Properties, and Singlet Oxygen Generation. **Langmuir**, v. 24, n. 21, p. 12534–12538, 4 nov. 2008a.

ROSSI, L. M. et al. Protoporphyrin IX nanoparticle carrier: Preparation, optical properties and singlet oxygen generation. **Langmuir**, v. 24, n. 21, p. 12534–12538, 4 nov. 2008b.

SAMIMI, H. et al. Alginate-based 3D cell culture technique to evaluate the half-maximal inhibitory concentration: an in vitro model of anticancer drug study for anaplastic thyroid carcinoma. **Thyroid Research**, v. 14, n. 1, 1 dez. 2021.

SANDER, T. et al. Meta-analysis on reporting practices as a source of heterogeneity in in vitro cancer research. **BMJ open science**, v. 6, n. 1, 1 jun. 2022.

SANTOS, T. V. S. DOS. Terapia Fotodinâmica: uma revisão dos conceitos gerais e dos avanços de novos sistemas carreadores desenvolvidos com base na nanotecnologia. 10 dez. 2020.

SANTOS, R. G. M. DOS SANTOS. **Sistemas Autoemulsificantes: uma alternativa viável para a veiculação de fármacos pouco solúveis em água**. Rio de Janeiro: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2013.

SAVJANI, K. T.; GAJJAR, A. K.; SAVJANI, J. K. Drug Solubility: Importance and Enhancement Techniques. v. 1957, n. 1957, 2012.

SCHAFFAZICK, S. R. et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 726–737, out. 2003.

SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery II. drug incorporation and physicochemical characterization. <http://dx.doi.org/10.1080/026520499289185>, v. 16, n. 2, p. 205–213, 2008.

SEYFERT, S.; UHL, A. International Workshop Dispersion Analysis (Berlin, 2011). **Applied Rheology**, v. 21, n. 5, p. 300–303, 1 mar. 2011.

SHAH, P.; BHALODIA, D.; SHELAT, P. Nanoemulsion: A pharmaceutical review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 1, n. 1, p. 24–32, jan. 2010.

SHAO, C. et al. Development of Cell Spheroids by Advanced Technologies. **Advanced Materials Technologies**, p. 2000183, 16 jun. 2020.

SHINODA, K.; ARAI, H. The Correlation between Phase Inversion Temperature In Emulsion and Cloud Point in Solution of Nonionic Emulsifier. **The Journal of Physical Chemistry**, v. 68, n. 12, p. 3485–3490, dez. 1964.

SILBERBERG, D. et al. Brain and other nervous system disorders across the lifespan — global challenges and opportunities. **Nature**, v. 527, n. 7578, p. S151–S154, 18 nov. 2015.

SILVA, J. R. DA. **Nanopartículas Magnéticas Funcionalizadas com Bicamadas Delaurato/Laurato e Laurato/Pluronic: Estudo da associação Comanfotericina**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, 27 maio 2008.

SILVA, T. M. DA. **O estudo do efeito da homogeneização de alto cisalhamento na estabilidade física de emulsões**. [s.l.] Instituto de Pesquisas Tecnológicas do Estado de São Paulo, 2015.

SIMÃO, D. O. et al. Preparation and cytotoxicity of lipid nanocarriers containing a hydrophobic flavanone. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 601, p. 124982, 20 set. 2020.

SINGH, Y. et al. **Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery**. **Journal of Controlled Release** Elsevier B.V., , 28 abr. 2017a. . Acesso em: 6 set. 2020

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 252, p. 28–49, 28 abr. 2017b.

SINGH, Y. et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p. 28–49, 28 abr. 2017c.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. **Die Pharmazie**, v. 65, n. 1, p. 9–14, jan. 2010.

SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Development, characterization, and photocytotoxicity assessment on human melanoma of chloroaluminum phthalocyanine nanocapsules. **Materials Science and Engineering: C**, v. 33, n. 3, p. 1744–1752, 1 abr. 2013.

SOLINAS, M. et al. Cannabidiol, a Non-Psychoactive Cannabinoid Compound, Inhibits Proliferation and Invasion in U87-MG and T98G Glioma Cells through a Multitarget Effect. 2013.

SOUZA, C. et al. Synergistic effect of photobiomodulation and phthalocyanine photosensitizer on fibroblast signaling responses in an in vitro three-dimensional microenvironment. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 222, p. 112256, 1 set. 2021.

SOUZA, G. R. et al. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. **Nature Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 291–296, 14 abr. 2010.

TENG, C. W. et al. Applications of indocyanine green in brain tumor surgery: review of clinical evidence and emerging technologies. **Neurosurgical Focus**, v. 50, n. 1, p. E4, jan. 2021.

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, n. 3, p. 279, 1987.

VALADARES, A. D. et al. Perfil Anatomopatológico e Imuno-histoquímico de Gliomas de Pacientes da Região de Maringá-PR. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 3, 21 jul. 2021.

VALDERRAMA, P.; BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Estado da arte de figuras de mérito em calibração multivariada. **Química Nova**, v. 32, n. 5, p. 1278–1287, 2009.

VAN STRATEN, D. et al. Oncologic Photodynamic Therapy: Basic Principles, Current Clinical Status and Future Directions. **Cancers**, v. 9, n. 2, 18 fev. 2017.

VASILEV, A. et al. Using Light for Therapy of Glioblastoma Multiforme (GBM). **Brain Sciences 2020, Vol. 10, Page 75**, v. 10, n. 2, p. 75, 31 jan. 2020.

VELASCO, G. et al. The use of cannabinoids as anticancer agents. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 64, p. 259–266, jan. 2016.

VU, B.; SOUZA, G. R.; DENGJEL, J. Scaffold-free 3D cell culture of primary skin fibroblasts induces profound changes of the matrisome. **Matrix Biology Plus**, v. 11, p. 100066, ago. 2021.

WEBER, J.; BEARD, P. C.; BOHNDIEK, S. E. Contrast agents for molecular photoacoustic imaging. **Nature Methods** 2016 **13:8**, v. 13, n. 8, p. 639–650, 28 jul. 2016.

WEINBERG, R. A. Mechanisms of malignant progression. **Carcinogenesis**, v. 29, n. 6, p. 1092–1095, 15 abr. 2008.

WEISWALD, L. B.; BELLET, D.; DANGLES-MARIE, V. Spherical Cancer Models in Tumor Biology. **Neoplasia**, v. 17, n. 1, p. 1–15, 1 jan. 2015.

WELLER, M. et al. PREDICTING CHEMORESISTANCE IN HUMAN MALIGNANT GLIOMA CELLS: THE ROLE OF MOLECULAR GENETIC ANALYSES. **Int. J. Cancer (Pred. Oncol.)**, v. 79, p. 640–644, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer key facts**.

XIAO, Z. et al. Interstitial photodynamic therapy in subcutaneously implanted urologic tumors in rats after intravenous administration of 5-aminolevulinic acid. **Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations**, v. 7, n. 3, p. 125–132, 1 maio 2002.

YAN, L. et al. Improved Photodynamic Therapy Efficacy of Protoporphyrin IX-Loaded Polymeric Micelles Using Erlotinib Pretreatment. **Biomacromolecules**, v. 18, n. 6, p. 1836–1844, 12 jun. 2017.

YAO, C.-H. et al. Exogenous Fatty Acids Are the Preferred Source of Membrane Lipids in Proliferating Fibroblasts. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 4, p. 483–493, abr. 2016.