



Universidade de São Paulo

Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto  
Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

“Nanocarreadores proteicos e fotoativos no tratamento de doenças neurológicas”

Tácila Gabriele Lopes

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

2018



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

Nanocarreadores proteicos e fotoativos no tratamento de doenças neurológicas

Tácila Gabriele Lopes

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. Antônio Claudio Tedesco

RIBEIRÃO PRETO-SP

2018

## FICHA CATALOGRÁFICA

Lopes, TÁCILA GABRIELE.

Nanocarreadores proteicos e fotoativos no tratamento de doenças Neurológicas. Ribeirão Preto, 2018..

100 p. : 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. Nanocarreadores poliméricos e proteicos, 2. Cross-linking, 3. Terapia fotodinâmica, 4. Glioblastoma Multiforme.

# FOLHA DE APROVAÇÃO

**Nome:** TÁCILA GABRIELE LOPES

**Título:** Nanocarreadores proteicos e fotoativos no tratamento de doenças neurológicas.

Dissertação de Mestrado 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, Área: Química.

Aprovado em: \_\_/\_\_/\_\_\_\_

## Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_ Instituição: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

## DEDICATÓRIA

A **Deus**, por me guiar, proteger e iluminar em todos os momentos da minha vida, me dando força, sabedoria e saúde para superar as dificuldades;

Aos meus amados **pais Rosangela Campos da Silva Lopes e Luiz Henrique Lopes** por todos os ensinamentos de vida, dedicação, paciência e amor incondicional. Por nunca terem me deixado desistir diante das dificuldades e por estarem sempre ao meu lado me incentivando e encorajando a seguir meus caminhos e buscar, sem medo, meus sonhos e ideais;

Ao meu amado **irmão Tígano Henrique Lopes** por todo amor, amizade, ensinamentos, conselhos, broncas, incentivos e por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida;

À minha amada **avó Therezinha Câmara da Silva** que sempre esteve ao meu lado me incentivando a conquistar meus sonhos.

## AGRADECIMENTOS

Em especial ao meu **orientador professor Dr. Antonio Claudio Tedesco**, o qual esteve presente durante toda minha jornada acadêmica dentro da Universidade de São Paulo, tanto como professor em sala de aula, quanto como orientador dentro do laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina. Só tenho a agradecer-lo por me deixar fazer parte dessa grande família de CNETianos e a tudo o que aprendi neste 6 anos de caminhada repletos de conquistas, aprendizados e sabedorias. Obrigada professor por todo aprendizado compartilhado, toda a dedicação, toda a paciência e todas as broncas, que me fizeram crescer não somente de forma profissional, como também pessoal;

Ao **prof. Dr. Alain Ponton** do Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC) em Paris e a **prof. Dra. Maria Inês Ré** do Laboratoire Recherche d'Albi en génie des Procédés des Solides Divisés, de l'Énergie et de l'Environnement (RAPSODEE) em Albi por todo conhecimento compartilhado, dedicação e pela receptividade com que me receberam nos seus respectivos laboratórios;

À **Fundação Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP** pela bolsa de mestrado sob o processo nº 2015/09125-6, e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior (BEPE) sob o processo nº 2016/21504-5 e, conseqüentemente, todos os recursos concedidos em ambas às bolsas, para o desenvolvimento do projeto de pesquisa e participação em congresso;

Em especial a **prof. Dra Andrielle de Castilho Fernandes** que não foi apenas minha co-orientadora, mas também uma grande amiga que esteve presente ao meu lado por muitos anos dentro do laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, compartilhando carinhosamente comigo seus conhecimentos, sabedorias, felicidades e tristezas. Obrigada por todos os ensinamentos, paciência, dedicação e luz nesses anos de convivência;

Aos **CNETianos Maryanne Melo, Jaqueline Gehlen, Nathália Davanzo, Dr Leonardo Barcelos, Maiko Carlos, Dra. Patrícia Goto, Prof. Dr. Diogo Pellosi, Dra. Andrielle Fernandes, Nathalia Candido, Ítalo Calori, Dr. Leonardo Franchi, Nayara Rezende, Graciely Gobo, Olimpia Martins, Cristiano Jayme, Camila Amantino, Henrique Piva, Luandra Takahashi, Carla Souza, Daniela Silvestrini e Prof. Dr. Fernando Primo** os quais foram amigos mais do que especiais. Obrigada por estarem presentes ao meu lado durante todos esses os anos de trabalho e dedicação e por

compartilharem comigo suas experiências, sabedorias, grandes risadas, preocupações, tensões, tristezas e felicidades, fazendo cada um dos meus dias mais leves e iluminados;

Aos amigos do Laboratoire Matière et Systèmes Complexes (MSC) **Pamela Daou, Carmen Aguiño, Xaquín Álvarez, Cristina Gila e em especial ao Alberto Varela** por me ajudarem a passar seis meses em Paris, na França, de uma maneira mais leve e feliz, apesar da longa distância de casa;

Em especial a **Prof. Dra. Jacqueline Azevedo e sua família** por toda ajuda e dedicação durante o curto período em que estive na cidade de Albi. Tudo não era pra passar de uma parceria de laboratório, mas se tornou uma linda amizade para toda a vida;

Aos amigos do Laboratoire Recherche d'Albi en génie des Procédés des Solides Divisés, de l'Énergie et de l'Environnement (RAPSODEE) **Ana Paula Matos e Bhanca Lins;**

À **Coni Padilla** por atravessar comigo os desafios, as dificuldades e as descobertas de estar num país diferente com saudade de casa e da família. Obrigada por se tornar, em tão pouco tempo, uma amiga tão especial;

Ao **Renato Ventresqui, Matheus Lima e Vanderlei Lima** que são amigos do coração, e estiveram presentes ao meu lado já há muitos anos apoiando, ajudando e incentivando em todos os momentos mais importantes e felizes da minha vida;

Aos **meus pais, irmão e família** que estiveram ao meu lado durante toda minha vida, me guiando e incentivando nos momentos de grande felicidade, conquistas e realizações. Obrigada do fundo do meu coração por me ajudando a superar as dificuldades, ansiedades e tristezas durante toda minha vida e, em especial, nos seis meses em que eu estive na França;

A **todos** que direta ou indiretamente fizeram parte da minha formação e que me incentivaram, acreditaram e torceram por mim;

À **Universidade de São Paulo** e aos **docentes e funcionários** do departamento de Química da Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto-USP;

**A Université Paris Diderot e École de Mines Albi Carmaux;**

**A Deus** por todas as conquistas e bênçãos recebidas durante toda minha vida.

*“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”*

**(Charles Chaplin)**



## RESUMO

LOPES, TÁCILA GABRIELE. **Nanocarreadores proteicos e fotoativos no tratamento de doenças neurológicas**. 2018. 105 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

O desenvolvimento de nanocarreadores a base de albumina são considerados biocompatíveis e biodegradáveis, e tem sido extensivamente estudada com objetivo de novas alternativas de tratamento para inúmeras doenças. A característica mais relevante reside no fato de que estes sistemas proteicos serem capazes de atravessar a barreira Hematoencefálica (BHE) e atingir as células-alvo, a partir de sinalizações por canais específicos na barreira cerebral. Por serem proteínas com ligações covalentes, pode-se afirmar que o processo de clivagem proteolítica tende a ser realizado pelas enzimas pertencente à família das proteases. Dada à importância desses sistemas de entrega de fármacos (DDS) e sua eficaz permeação através da BHE, propôs-se um desenvolvimento científico multidisciplinar combinando-se protocolos, técnicas e ensaios experimentais das áreas de tecnologia farmacêutica, nanotecnologia e química para realização da incorporação do fotoativo ou outros compostos, como a ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc ou Pc) livre e/ou pré encapsuladas e as nanopartículas magnéticas, nestes sistemas de DDS conhecidos como nanopartícula de albumina (NpA). Dentre as técnicas usadas nestes estudos destaca-se tanto o método de cross-linking térmico (via Térmica) quanto o químico (via Química), sendo que no segundo, foram utilizados 2 reagentes distintos, o glutaraldeído e o gliceraldeído, os quais foram analisados e comparados neste projeto de pesquisa. Análises de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), Microscopia de Força Atômica (MFA), medidas de estabilidade por ZetaSizer demonstraram claramente que as nanopartículas preparadas pelos diferentes reagentes possuíam formato esféricos, diâmetro médio em torno de 200 nm e eram homogêneas, entretanto, apenas os nanocarreadores preparados com GU apresentaram elevada repulsão eletrostática (prevenindo a agregação das mesmas). Após caracterização, os estudos foram baseados na utilização da AlClPc como fotoativo aplicado a terapia fotodinâmica (TFD) para o tratamento *in vitro* das doenças que acometem o sistema nervoso central (SNC).

**Palavras Chave:** Nanocápsula polimérica; Nanopartículas de albumina; Cross-linking químico e térmico; Ftalocianina de cloro alumínio e Nanopartícula magnética; Terapia fotodinâmica; e Linhagem U87MG.

## ABSTRACT

LOPES, TÁCILA GABRIELE. **Protein nanocarriers and photoactives in the treatment of neurological diseases**. 2018. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Faculdade de Filosofia Ciências e Letras de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

The development of albumin-based nanocarriers, which are nontoxic and biocompatible and biodegradable, have been extensively studied for seeking new alternatives of the treatment for numerous diseases. The most relevant characteristic is that these protein-based systems could cross the blood-brain barrier (BBB) and selectively reach the target cells within of the brain. These nanocarriers are protein-based and have covalent bonds, and consequently it can be digested by a class of enzymes belonging to the protease family, which rapidly degrade the protein-based nanoparticles through of the proteolytic cleavage process. Given the importance of these drug delivery systems (DDS) and their effective permeation through BBB, it was proposed a multidisciplinary scientific development combining protocols, techniques and experimental tests of the areas of pharmaceutical technology, nanotechnology and chemistry to carry out the incorporation of the photoactive or another compound, as aluminum chlorine phthalocyanine (AlClPc or Pc), free and/or pre-encapsulated or magnetic nanoparticles in these albumin-based DDS systems known as albumin nanoparticles (NpA). Among the techniques used in these studies we highlight by thermal cross-linking method (via Thermal) and chemistry (via Chemistry), in this second, it was used 2 reagents, glutaraldehyde and glyceraldehyde, that were analyzed and compared in this research project. From Scanning Electron Microscopy, Atomic Force Microscopy, Zeta potential measurements, we have clearly shown that the elaborated nanoparticles (NPs) have a smaller size with a spherical shape and are more homogeneous, however only the nanoparticles prepared with glutaraldehyde showed greater electronic repulsion (preventing their aggregation). After the characterization, the studies were based on the use of AlClPc as a photoactive applied in the photodynamic therapy (PDT) for the treatment of central nervous system (CNS) diseases.

**Keywords:** Polymeric nanocapsule; Albumin nanoparticles; Chemical and thermal cross-linking; Aluminum chlorine phthalocyanine and Magnetic nanoparticles, Photodynamic therapy; and U87MG cell line.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$^1\text{O}_2$	Oxigênio Singlete
AlClPc ou Pc	Ftalocianina De Cloro Alumínio
BHE	Barreira Hematoencefálica
Via Química	Cross-linking Químico
Via Térmica	Cross-linking Térmico
DDS	Sistema de Entrega de Fármacos
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico
DMSO	Dimetil Sulfóxido
EROs	Espécies Reativas de Oxigênios
FDA	Food and Drugs Administration
HSA	Soro Albumina Humana
PdI	Índice de Polidispersividade
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MFA	Microscopia de Força Atômica
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide
mV	Milivolts
Nc	Nanocápsula Polimérica
Nm	Nanômetros
NpA	Nanopartículas proteica a base de Albumina
NpM	Nanopartícula Magnética
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Fosfato-Salino
pH	Potencial Hidrogeniônico
PI	Potencial Isoelétrico
PLGA	Poli (D, L-lactideco-glicolido)
Rpm	Rotações por Minuto
SD	Desvio Padrão
SFB	Soro Fetal Bovino
SNC	Sistema Nervoso Central
TFD	Terapia Fotodinâmica

## SUMÁRIO

<b>I- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>21</b>
1 Nanotecnologia .....	21
2 Câncer.....	21
3 Glioblastoma Multiforme .....	22
4 Sistemas de entrega de fármacos (DDS) .....	23
5 Nanocarreadores a base de albumina (NpA) .....	24
6 Agente reticulante .....	25
7 Processo de liofilização (Freeze Drying) .....	26
8 Barreira hematoencefálica (BHE).....	27
9 Terapia fotodinâmica (TFD) e os fotossensibilizadores .....	27
10 Nanopartícula magnética (NpM) .....	30
<b>II- OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>III MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
1 Encapsulação/Incorporação da AICIPc .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2 Incorporação da nanopartícula magnética .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
3 Preparação da nanocápsula polimérica .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4 Preparação da nanopartícula proteica via térmica .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5 Preparação da nanopartícula proteicas via química .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
6 Liofilização das NpA (via cross-link químico) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
8 Monitoramento da estabilidade acelerada (Lumisizer) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
9 Linearidade por espectrofotometria .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
10 Estudo de quantificação dos fármacos .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
11 Caracterização por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (MFA) .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
12 Medida de diâmetro médio (Nanosight).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
13 Cultivo celular da linhagem de glioblastoma U-87 MG .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
14 Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
15 Análise de viabilidade celular da AICIPc Livre (Ensaio de MTT)	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
16 Análise de viabilidade celular das NpA Vazia (Ensaio de MTT)	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

- 17 Análise de viabilidade celular das NpA (Pc) (Ensaio de MTT)**Erro! Indicador não definido.**
- 18 Análise de internalização celular da NpA (Pc) (Microscopia Confocal)**Erro! Indicador não definido.**
- 19 Análise de indução da morte celular (ViaCount<sup>®</sup>)..... **Erro! Indicador não definido.**
- 20 Determinação do mecanismo de morte celular (Anexina) ... **Erro! Indicador não definido.**
- 21 Análises estatísticas..... **Erro! Indicador não definido.**

**IV RESULTADOS E DISCUSSÃO.....** Erro! Indicador não definido.

**1 Estudo realizados com cross-link térmico .....** Erro! Indicador não definido.

**1.1 Estudo de estabilidade das NpA (via Térmica) .....** Erro! Indicador não definido.

1.2 Análise do tempo de vida de prateleira através da estabilidade acelerada (Lumisizer)**Erro! Indicador não definido.**

1.3- Quantificação por espectrofotometria da NpA (Pc) ..... **Erro! Indicador não definido.**

**2 Estudo realizados com cross-link químico .....** Erro! Indicador não definido.

**2.1 Estudo do glutaraldeído como agente reticulante .....** Erro! Indicador não definido.

2.1.1 Análise de otimização da NpA, influência na ausência de Cross-Link e tempo de armazenamento ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.1.2 Método espectrofotométrico para determinação da AIClPc nas amostras**Erro! Indicador não definido.**

2.1.3 Quantificação da AIClPc incorporada..... **Erro! Indicador não definido.**

2.1.4 Caracterização superficial das NpA (MEV e MFA) ..... **Erro! Indicador não definido.**

2.1.5 Análise de viabilidade celular de NpA (vazia), AIClPc livre e NpA (Pc) (MTT)**Erro! Indicador não definido.**

2.1.6 Análise de internalização da NpA (Pc) (Microscopia Confocal)**Erro! Indicador não definido.**

2.1.7 Aplicação da terapia fotodinâmica na NpA (Pc) (Ensaio de MTT)**Erro! Indicador não definido.**

**2.2 Estudos realizados com nanopartícula magnética (via química/glutaraldeído)**Erro! Indicador não definido.

2.2.1 Análise de estabilidade da NpA (Pc e/ou NpM) após liofilização e depois de 6 meses de armazenamento (Zetasizer e Nanosight)..... **Erro! Indicador não definido.**

2.2.2 Caracterização superficial das NpA (Pc e/ou NpM) (MEV e MFA)**Erro! Indicador não definido.**

2.2.3 Viabilidade celular das NpA (Pc e/ou NpM) (Ensaio de MTT e Via-Count<sup>®</sup>)**Erro! Indicador não definido.**

2.2.4 Análise de internalização da NpA (Pc) por Microscopia Confocal**Erro! Indicador não definido.**

**2.3 Estudo do gliceraldeído como agente reticulante.....** Erro! Indicador não definido.

2.3.1 Análise de otimização do gliceraldeído e estabilidade ao longo do tempo**Erro! Indicador não definido.**

2.3.2- Caracterização superficial das NpA (MEV e MFA)..... **Erro! Indicador não definido.**

2.3.3 Análise de viabilidade celular (Ensaio de MTT e Via-Count<sup>®</sup>)**Erro! Indicador não definido.**

2.3.4 Análise da incorporação da NpA (Pc) por Microscopia Confocal**Erro! Indicador não definido.**

2.3.5 Análise de viabilidade celular após terapia fotodinâmica por ensaio de MTT**Erro! Indicador não definido.**

**V CONCLUSÕES ..... 91**

**VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 94**

**ANEXOS – Material Suplementar ..... Erro! Indicador não definido.**

**ANEXO A- Paris França..... Erro! Indicador não definido.**

**ANEXO B - Albi França..... Erro! Indicador não definido.**

**ANEXO C - Resumo estendido e artigo publicado durante o presente trabalho Erro! Indicador não defini**

# Introdução



## I- INTRODUÇÃO

### 1 Nanotecnologia

Estudos da nanotecnologia a serviço da saúde têm apresentado inúmeras aplicações médicas através do desenvolvimento de nanodispositivos e nanomateriais que possuem propriedades farmacológicas (FONSECA ROLANDO ALBERTO et al., 2017). Segundo a literatura, nanomedicina envolve a formação de partículas em escalas de níveis atômicos ou moleculares e que apresentam dimensões que variam de 1 a 100 nm. Contudo, o prefixo “nano” também pode ser correlacionado a distribuições de tamanho com valores pouco acima de 100 nm (NOBILE e NOBILE, 2017).

Atualmente, a tecnologia voltada para a escala “nano” tem apresentado duas vertentes distintos, um conhecido por “bottom-up” (nanotecnologia molecular) e outro pelo “top-down”, os quais estão diretamente correlacionados a formação do tamanho estrutural das partículas. De acordo com Sanchez e seus colaboradores, a redução de estruturas a escalas “nano” corresponde ao conceito top-down, enquanto que o processo de automontagem partindo de átomos ou componentes moleculares é conhecido por bottom-up, sendo essa considerada promissora para o desenvolvimento de materiais nanotecnológicos (SANCHEZ e SOBOLEV, 2010; PATTEKARI et al., 2011).

A nanotecnologia tem apresentado elevado interesse na área da medicina voltada, mais especificamente, para os tratamentos de câncer, visto que, tal tecnologia é focada no desenvolvimento e aperfeiçoamento dos sistemas de entrega de fármacos (DDS), o qual tem como objetivo substituir as terapias tradicionais por nanocarreadores terapêuticos, que são direcionados diretamente as células-alvo, elevando a eficácia terapêutica e reduzindo os efeitos colaterais (BREGOLI et al., 2016; WEN et al., 2017).

### 2 Câncer

De acordo com o World Health Organization (WHO), estima-se que no ano de 2012 cerca de 14 milhões de novos casos de câncer foram diagnosticados, sendo esta considerada uma das principais causas de mortalidade do mundo, com 8,8 milhões de morte no ano de 2015 (XU et al., 2017). Para as próximas duas décadas espera-se que ocorra um aumento de 70% dos casos, elevando, conseqüentemente, a demanda por novos métodos de diagnósticos e

tratamento nos diferentes graus de desenvolvimento desta patologia (DE MEJIA , BRADFORD e HASLER, 2003).

O câncer é considerado uma doença causada por ocorrências sucessivas de mutações gênicas que provocam uma proliferação celular anormal, as quais podem ser advindas de heranças genéticas, ou devido a exposições ambientais, como a radiação UV provinda do sol, que geram danos ao DNA no decorrer da vida (National Cancer Institute).

Sabe-se, que os tumores ou neoplasias malignas se diferem tanto na expressão de genes quanto na aparência, apresentando uma grande variedade de anormalidades genéticas (LIMA et al., 2012). Em contrapartida, as neoplasias benignas compreendem um aglomerado de células semelhantes ao tecido original, do qual originaram, e que se dividem de forma lenta. Este tipo de câncer apresenta um prognóstico quase sempre favorável (De Mejia et al., 2003).

Os tumores relacionados diretamente ao sistema nervoso central, como no caso do glioblastoma, permanecem, ainda nos dias atuais, como um grande desafio ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico e tratamento. Em função disto são inúmeros os trabalhos de pesquisa desenvolvidos em todo o mundo, buscando, cada vez mais, novas modalidades de tratamento para esses tipos de neoplasias (WELLER et al., 2012).

### **3 Glioblastoma Multiforme**

O Glioblastoma Multiforme (GBM), segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), é classificado como um tumor de grau IV (HANIF et al., 2017), os quais são considerados um dos tumores mais agressivos, invasivos e frequentes que acometem o sistema nervoso central (SNC) (RUAN et al., 2017), visto que o GBM é altamente resistente ao tratamento quimioterápico, uma vez que as células anormais apresentam elevada capacidade de reparo do DNA, existência de células quimioresistentes, devido às áreas de hipóxia, e presença de células em diversos estágios do ciclo celular e não somente na fase G2/M (SELBO et al., 2012).

Além disso, a presença da barreira hematoencefálica (BHE) é responsável impedir a entrada dos fármacos ao SNC, tornando-os ineficazes no tratamento do glioblastoma (HORODYCKID et al., 2017). Em conjunto, todos esses obstáculos são considerados mecanismos importantes para a sobrevivência das células cancerosas durante o tratamento.

Dessa forma, ainda nos dias atuais, o GBM apresenta prognósticos pouco favoráveis, e sobrevida média de aproximadamente um ano (EFFERTH et al., 2017; LOUIS et al., 2007).

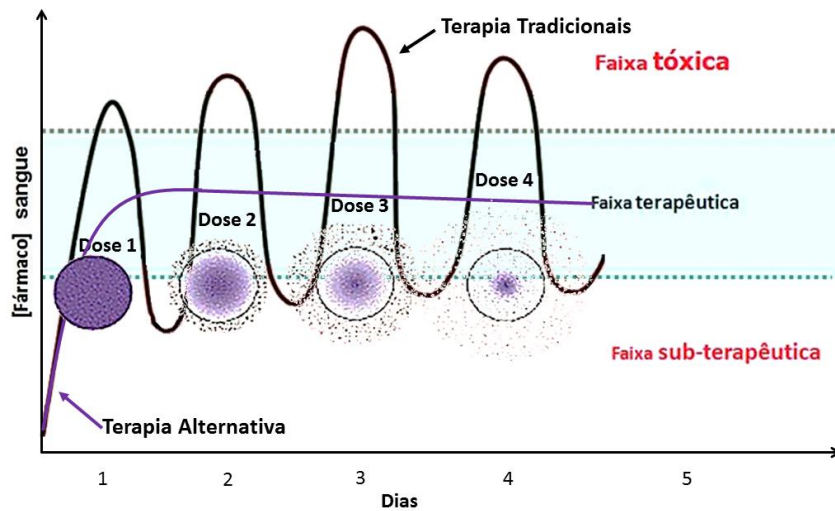
Confirmando, a necessidade em desenvolver um sistema de entrega de fármacos que sejam biocompatíveis a essas barreiras físicas presentes no organismo (Selbo et al., 2012).

#### 4 Sistemas de entrega de fármacos (DDS)

Os sistemas de nanoveiculação de ativos são considerados transportadores eficazes, biocompatíveis, biodegradáveis e estímulo-responsíveis (ZHANG , CHAN e LEONG, 2013), que podem ser administrados principalmente via intravenosa, com capacidade de se deslocarem pelo organismo apresentando uma elevada especificidade, pois o fármaco atinge diretamente as células alvo (PIMENTEL et al., 2007; BERNARDI et al., 2009; FRUCHON e POUPOT, 2017) ou os neurônios afetados pelas placas  $\beta$ -amiloide, na doença de Alzheimer (AZEVEDO e FERREIRA, 2006; ROBINSON , LEE e LEONENKO, 2017), minimizando os impactos sobre as células saudáveis do organismo.

Tais estratégias terapêuticas usando transportadores como lipossomas; nanopartículas poliméricas; e dendrímeros (DE PAULA et al., 2013; ROY et al., 2003; PRABHU , PATRAVALE e JOSHI, 2015; NOBILE e NOBILE, 2017), contrapõem os tratamentos já existentes como quimioterapia, radioterapia e cirurgia, os quais, por não serem seletivos, podem causar danos irreversíveis aos tecidos saudáveis, limitando assim as doses e frequências com que serão aplicadas nos pacientes (HALEY e FRENKEL, 2008; KUDARHA e SAWANT, 2017).

Os sistemas nanoestruturados apresentam elevada importância devido a sua liberação sustentada, apresentando disponibilidade inicial de 40 a 50 % da concentração total do ativo e na sequência, uma liberação, por um período de tempo prolongado mantendo os níveis de concentrações do ativo baixo e constante, proporcionando ao paciente uma melhor aceitabilidade do tratamento e sem efeitos colaterais (**Figura 1**) (ROSSI-BERGMANN, 2008).



**Figura 1.** Estudo de comparação entre a liberação controlada utilizando sistemas de entrega de fármacos, e as terapias tradicionais como a quimioterapia ou a radioterapia (PRIMO, 2009. Tese)

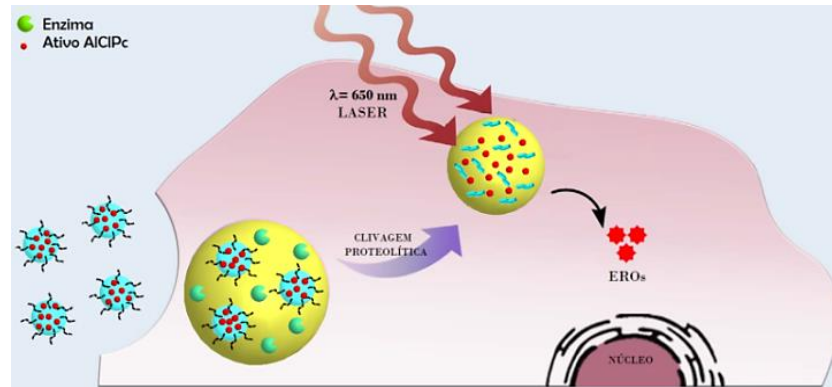
## 5 Nanocarreadores a base de albumina (NpA)

Atualmente, estudos revelam uma elevada importância no avanço das pesquisas voltadas para utilização de nanocarreadores a base de albumina, uma vez que estes sistemas não apresentam toxicidade, são biocompatíveis e biodegradáveis (WOODS et al., 2015; AN e ZHANG, 2017). Associado ao fato de ser a proteína em estudo, as albuminas, são solúveis em água e encontrar-se de forma abundante no plasma humano, com uma concentração aproximada de 60  $\mu\text{M}$  (GHUMAN et al., 2005). Essas partículas a base de albumina já foram aprovadas para práticas clínicas pela Food and Drugs Administration (FDA) nos Estados Unidos (MISRA, ACHARYA e SAHOO, 2010), com o registro de duas partículas a base de soro albumina humana (HSA), com nomes comerciais de Alunex<sup>®</sup> e Abraxane<sup>®</sup> (DREIS et al., 2007; GHOSH et al., 2016; KINOSHITA et al., 2017).

A importância do desenvolvimento desses nanocarreadores a base de albumina fundamenta-se basicamente em decorrência do rápido e fácil processo de digestão das mesmas dentro do organismo humano, realizados pela família das enzimas conhecidas por proteases (SAILAJA, AMARESHWAR e CHAKRAVARTY, 2011). A degradação da nanopartícula de albumina ocorre no processo de clivagem proteolítica pelas das vias lisossomais, aonde as proteases quebram as ligações covalentes formadas pelo agente de reticulação química, como glutaraldeído e gliceraldeído (AI et al., 2016). A partir desta clivagem há uma liberação dos ativos incorporados nas nanoestruturas para o meio intracelular (JAHANSHAH e BABAEI, 2008), para que então seus sítios específicos sejam

ativados de forma natural ou por fotoativação na presença do fotossensibilizante e/ou hipertermia na presença de um composto magnético.

Nestes casos, observa-se um efeito de dose dependente no processo de ativação e liberação das Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), produzidas durante a ativação das partículas de Albumina contendo o ativo, como pode ser observado na **Figura 2**.



**Figura 2.** Processo de quebra proteolítica da nanopartícula de Albumina internalizada no meio intracelular, seguida da aplicação da irradiação do laser ( $\lambda = 650 \text{ nm}$  - Faixa vermelha do UV-Visível) [Imagem modificada de (AI et al., 2016)]

Entretanto, os novos sistemas de liberação apenas são considerados efetivos se penetrarem as barreiras presentes no organismo, como a membrana celular e a barreira hematoencefálica (BHE), e atingirem seletivamente as células-alvo, aumentando a concentração intracelular do fármaco e reduzindo as toxicidades limitantes da dose e dos efeitos colaterais nos tecidos saudáveis vizinhos (PARANJPE e MULLER-GOYMANN, 2014).

## 6 Agente reticulante

O processo conhecido como ligação cruzada (“crosslinking”) ou reticulação química do grupamento amino, envolve necessariamente a utilização de agentes químicos com baixo peso molecular, como o formaldeído, glutaraldeído ou gliceraldeído (PATEL et al., 2017).

Quando na presença de proteínas, ocorrem reações químicas conhecidas por mecanismos de base de schiff, onde o nitrogênio (N), presente nas albuminas, realiza um ataque nucleofílico ao carbono carbonílico do aldeído, presente no agente reticulante, formando uma ligação dupla entre o carbono e o nitrogênio, a qual é considerada altamente estável e conhecida como imina  $\text{-C=N}$  (LI et al., 2014; LI et al., 2016; ORYAN et al., 2018).

Dentre os reagentes descritos, de acordo com a literatura, os di-aldeídos, como o glutaraldeído, formam ligações de cross-link mais eficientes quando comparados aos mono-

aldeídos, como o gliceraldeído (YANG et al., 2017), entretanto o gliceraldeído pode ser considerado um reagente menos citotóxico (ALIAKBARSHIRAZI e TALEBIAN, 2017).

## **7 Processo de liofilização (Freeze Drying)**

O processo de liofilização, também conhecido como freeze drying, apresenta elevada importância no tempo de vida de prateleira de amostras termolábeis, como as proteínas, tornando-se, portanto, mais estáveis à temperatura ambiente. Entretanto, tal processo pode acarretar no “calapso” da amostra, apresentando insolubilidade, instabilidade e perda da atividade, com conseqüente redução dos efeitos biológicos (FANG et al., 2017).

Essa técnica permite que a secagem ocorra através do método da sublimação, sendo essa a secagem primária, onde a remoção das moléculas de água, ocorrem do estado sólido para o gasoso, sob pressão reduzida, com remoção de cerca de 90% da água. Entretanto, posteriormente, a liofilização apresenta uma secagem secundária responsável pela remoção de aproximadamente 5% da água presente na amostra, através do processo de adsorção das moléculas de água pela quebra das ligações iônicas da mesma com superfície da partícula (ISHWARYA , ANANDHARAMAKRISHNAN e STAPLEY, 2015).

Contudo, a etapa de maior importância para o processo da liofilização é a fase do congelamento, tendo em vista que a taxa de alteração da temperatura por provocar alterações estruturais significativas das amostras. Por conseguinte, nesta etapa é necessário acompanhar o ponto de transição vítrea, a velocidade e o ponto de congelamento, bem como a composição e a temperatura crítica da amostra (HORN e FRIESS, 2018).

Complementarmente, alguns açúcares como a sacarose, trealose, manitol ou dextrose, conhecidos como crioprotetores, ajudam a proteger as partículas dos danos causados, tanto pelas variações bruscas quanto pelas baixas temperaturas, impedindo que as amostras sofram processo de deformação estrutural (VARSHOSAZ et al., 2012).

De acordo com Dadparvar e seus colaboradores, as nanopartículas de albumina apresentam resultados promissores quando submetidas ao processo de liofilização (DADPARVAR et al., 2014).

## 8 Barreira hematoencefálica (BHE)

A barreira hematoencefálica (BHE) é considerada essencial na separação entre o sistema nervoso central (SNC) e os tecidos periféricos, impossibilitando a permeação de agentes patogênicos, células livres e moléculas tóxicas que se encontram presentes no sistema circulatório (SARAIVA et al., 2016).

A BHE é caracterizada por junções intracelulares estreitas e ausência de fenestrações, permitindo que somente os nutrientes essenciais sejam transportados, através de transportadores altamente seletivos, para SNC, o que, conseqüentemente, impede a absorção de mais de 98% de produtos farmacêuticos (ZENSI et al., 2010).

Entretanto, estudos atuais comprovam a eficiência dos sistemas de entrega de fármacos no tratamento de doenças que acometem o SNC. Com esse propósito, Lin e seus colaboradores, através de estudos *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que as nanopartículas a base de albumina apresentam resultados promissores e elevado potencial terapêutico, ao comprovar, através de imagens de bioluminescência, que as mesmas atravessaram a barreira hematoencefálica acumulando-se no tecido cerebral (LIN et al., 2016).

## 9 Terapia fotodinâmica (TFD) e os fotossensibilizadores

Já bastante consolidada na área da medicina, a terapia fotodinâmica (TFD), tem sido considerado um procedimento clinicamente aprovado por ser minimamente invasivo com potencial para atender várias patologias que ainda não apresentam tratamentos 100% eficazes (AGOSTINIS et al., 2012).

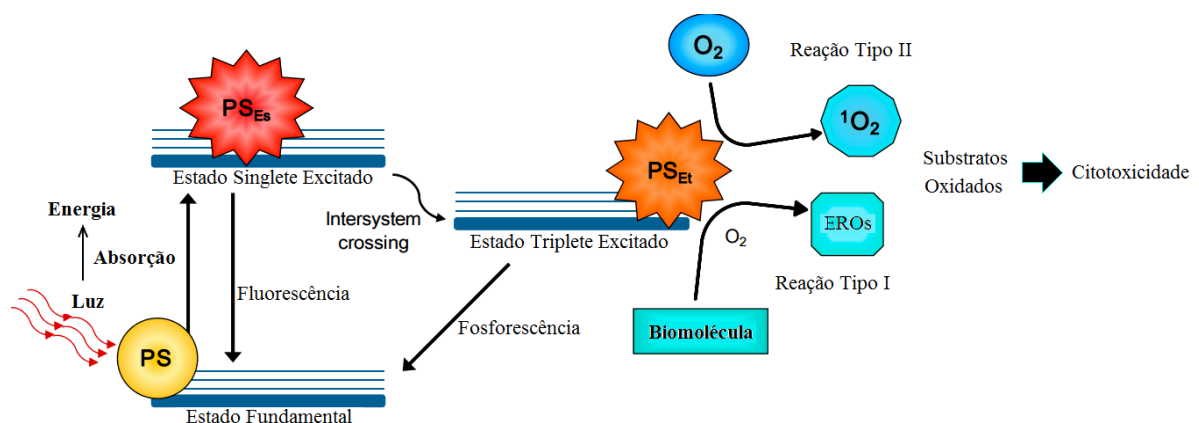
A TFD fundamenta-se na associação da luz laser, que ao ativar um agente fotossensibilizador, exerce uma atividade citotóxica seletiva sobre a célula-alvo, minimizando, conseqüentemente, os danos causados aos tecidos vizinhos, bem como os efeitos colaterais indesejáveis, que são comuns nos tratamentos clássicos da quimioterapia e radioterapia (FERREIRA et al., 2013; PRIMO et al., 2012; ZHOU, 1989).

Atualmente, os fotossensibilizadores são divididos em três gerações distintas, a 1ª geração, corresponde preferencialmente a Photofrin®, que é derivada das hematoporfirina, no entanto são consideradas ineficientes por apresentarem baixo valor de comprimento de onda, e necessidade de fotossensibilização prolongada da região cutânea (MUEHLMANN et al., 2014).

Diferentemente, os de 2ª e 3ª geração, como, por exemplo, os derivados da ftalocianina, que apresentaram resultados consideravelmente promissores nos tratamentos da TFD (GALLEGO- GÓMEZ et al., 2009), pois possuem elevada absorção de luz na região de 650 a 680 nm, alta estabilidade térmica, capacidade de ajustar seu potencial de oxidação e redução, acúmulo prolongado nas células e elevado rendimento quântico. Contudo, os derivados da ftalocianina, como a ftalocianina de cloro alumínio (AlClPc), apresentam elevada hidrofobicidade e portanto, são insolúveis em água ou solventes biologicamente compatíveis, devido a isso, é necessário o uso de novas tecnologias de veiculação de fármacos para possíveis aplicações biológicas (GALLEGO- GÓMEZ et al., 2009).

Por tanto, TFD se baseia em três componentes essenciais, como os fármacos fotossensibilizantes (FF), a luz e o oxigênio molecular, presente nos tecidos biológicos, os quais individualmente não apresentam citotoxicidade, mas em conjuntos iniciam uma reação fotoquímica e fotobiológica que leva a resposta biológica controlada e desejada.

O processo da ação terapêutica ocorre durante a absorção da luz pelo FF, na região visível do espectro eletromagnético, que apresenta propriedades espectroscópicas que são capazes de desencadear uma série de reações fotofísicas e fotoquímicas (AGOSTINIS et al., 2012; DOUGHERTY et al., 1998), provocando uma cascata de eventos, que resultam em última instância na produção controlada e específica de Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), tais como o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ) e outras espécies reativas como radicais livres ou ânions radicais, os quais destroem substratos celulares que por sua vez induzem a apoptose e necrose das células atingidas (CICILLINI et al., 2009; LIANG et al., 2011; SIQUEIRA-MOURA; PRIMO; TEDESCO, 2010).



**Figura 3.** Diagrama de Jablonsky visando demonstrar o processo de fotoativação, a partir de transições eletrônicas, que darão origem aos mecanismos de fotossensibilização molecular [Imagem modificada de (CALIXTO et al., 2016)]



Como observado na **Figura 3**, o composto fotossensibilizante em seu estado normal é caracterizado por elétrons emparelhados com spins contrários em orbital molecular de baixo nível de energia, configuração conhecida como estado singlete, e a configuração dos elétrons em orbital energeticamente inferior é chamada de estado fundamental ( $PS^0$ ). Entretanto, seguida a absorção de luz na forma de fótons, um desses elétrons da molécula fotoativa é impulsionado para um orbital de maior nível energético, atingindo o primeiro estado singlete excitado ( $^1PS^*$ ), mas sem mudança do seu spin. Logo após um curto período de tempo (nanossegundos), a molécula excitada retorna ao seu estado fundamental emitindo fótons (emissão de fluorescência) ou por meio de conversão interna em calor.

Além disso, o agente fotossensibilizante no estado singlete excitado pode sofrer também um processo de conhecido como cruzamento intersistemas, invertendo o spin do elétron excitado, o que propicia a formação do estado triplete excitado ( $^3PS^*$ ), o qual distinguido por serem elétrons desemparelhados e com o mesmo spin, bem como no tempo de vida longo dos estados excitados (microsegundos). O composto fotoativo no seu estado triplete excitado retorna ao seu estado fundamental emitindo um quantum de radiação eletromagnética e esse processo é conhecido como fosforescência.

Os compostos fotossensibilizantes no estado triplete excitado podem induzir reações fotoquímicas em moléculas próximas. Tais reações são conhecidas como Reação do Tipo I e Tipo II como podem ser observados na **Figura 3**.

Na reação fotoquímica do Tipo I ocorre transferência de elétrons ou prótons ao oxigênio ou outras moléculas adjacentes produzindo ânions ou cátions radicais, respectivamente. É provável que esses radicais reajam com o oxigênio molecular para produzir espécies reativas de oxigênios (EROs), resultando frequentemente na formação de íons superóxidos devido a transferência de um elétron da molécula fotoativa para o oxigênio molecular. Já, na reação do Tipo II a molécula fotossensibilizante no seu estado triplete excitado transfere sua energia, e não elétrons, diretamente ao oxigênio molecular para formar o primeiro estado excitado do oxigênio, mais conhecido como oxigênio singlete ( $^1O_2$ ). Ambas as reações fotoquímicas podem ocorrer simultaneamente e a proporção entre essas reações depende do agente fotoativo usado, bem como das concentrações de substratos e oxigênio (MOURA, M. P. D. S., 2011).

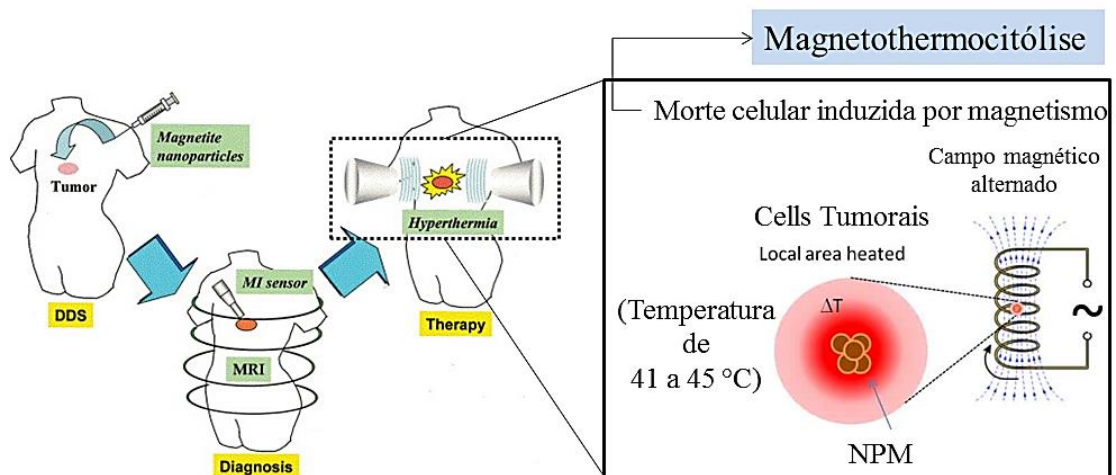
## 10 Nanopartícula magnética (NpM)

A nanopartícula magnética é formada de materiais nanoestruturados com propriedades reológicas que permitem serem conduzidas através da aplicação do campo magnético (KOBAYASHI; ITO e HONDA, 2016). Logo, sua elevada especificidade, sugere um aumento da concentração do fármaco no tecido-alvo, reduzindo, conseqüentemente, a quantidade de droga requerida, e, portanto, a toxicidade e o custo dos tratamentos (POURMEHRAN , GORJI e GORJI-BANDPY, 2016).

Existem inúmeros tipos de óxidos de metal, como magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ) as quais tem apresentado elevado interesse de uso na biomedicina, devido à baixa toxicidade, relativa facilidade de funcionalização e elevada magnetização (CALERO et al., 2014).

A magnetohipertermia corresponde a um aumento da temperatura causada pela aplicação do campo magnético. Conseqüentemente, ao serem adicionadas no organismo e na presença de campo magnético externo com frequência alternada, as NpM provocam geração de calor, mantendo a taxa de temperatura das células tumorais de 41 a 45°C, causando a magnetotermocitolise ou morte celular induzida por magnetismo (KUMAR e MOHAMMAD, 2011) (**Figura 4**). Esta técnica é considerada promissora no tratamento de câncer, pois, a condução magnética facilita o alcance do fármaco em atingir tecido canceroso, gerando redução dos efeitos colaterais, confirmada através de ensaios clínicos (LAURENT et al., 2011).

Entretanto, o fator mais importante é a propriedade magnética intrínseca, a qual pode ser observada por imagem de ressonância magnética (IRM), ou seja, as NPMs podem ser usadas como agentes de contrastes para o monitoramento tumoral, devido à elevada sensibilidade causada pela modificação do tempo de relaxação do próton (KIM et al., 2016), substituindo os tratamentos convencionais que usam agentes de contraste com baixa sensibilidade para a detecção de pequenos tumores (ZHANG , LIAO e BAKER, 2010).



**Figura 4.** Tratamento por hipertermia com aplicação de campo magnético alternado para o tratamento de células tumorais, o qual permite ainda realizar o acompanhamento do tumor por imagem de ressonância magnética [Imagem modifica de (ITO et al., 2005)]

Por conseguinte, esta classe de Nps podem ser usadas ao mesmo tempo como proposta terapêutica e diagnóstica, conhecimento como propriedades teranósticas (LIU et al., 2016; YONG et al., 2016).

Contudo, a aplicação das NPMs voltadas para o sistema nervoso central (SNC) apresenta baixa eficácia no sistema de entrega de fármacos, devido às restrições da barreira hematoencefálica (BHE) que proíbe o transporte de aproximadamente 98% das moléculas, sendo que, a vasta maioria dos compostos farmacêuticos não podem adentra o SNC (VON ROEMELING et al., 2016). Para contrabalancear essa desvantagem e visar à administração farmacológica com poucos efeitos colaterais ao paciente, propõe-se a incorporação das NpM na nanopartícula à base de albumina.

Assim sendo, é possível concluir que a incorporação da NpM deve facilitar o carreamento da nanopartícula de albumina na direção do tecido cerebral, quando induzida por campo magnético, e, conseqüentemente, atravessará a barreira hematoencefálica, devido a presença da albumina. No interior das células cerebrais, ocorrerá a degradação das partículas e conseqüente liberação de ambos os ativos, sendo que a AICIPc será fotoativada causando a morte celular por geração de espécies reativas de oxigênio (EROS) e as NPM, na presença de campo magnético alternado, causará elevação de temperatura e conseqüente morte celular, os quais já foram previamente realizados, *in vitro*, por De Paula e seus colaboradores (PRIMO et al., 2008; DE PAULA et al., 2015). Portanto, ambos ativos proporcionara uma maior morte celular com liberação contínua e programada dos ativos, mantendo-os com elevada concentração por um período de tempo prolongado dentro do tecido alvo.

Portanto, a partir das abordagens realizadas, pode-se explorar a área da nanobiotecnologia associando o uso de nanopartícula de albumina incorporadas, separadamente e em conjunto, com nanopartícula magnética e fotoativo, inicialmente para aplicações *in vitro*, buscando assim, uma forma de contornar limitações comuns no tratamento do câncer de Glioblastoma Multiforme. Dessa forma, abre-se uma linha de pesquisa muito promissora que apresenta como possibilidade desenvolver um potencial inovador.

# Objetivos

## **II- OBJETIVOS**

A proposta para esta dissertação de mestrado se baseou no desenvolvimento de uma nova droga terapêutica, explorando a área da nanotecnologia, para contornar as limitações existentes nos tratamentos de doenças que acometem o sistema nervoso central. Para isto, foram desenvolvidos e caracterizados sistemas proteicos nanoestruturados preparados por cross-link térmico e químico associado com ftalocianina de cloro alumínio e a nanopartícula magnética, sendo que para o desenvolvimento do método químico foram utilizados dois agentes reticulantes distintos, o glutaraldeído e o gliceraldeído, buscando determinar qual reagente será ideal na formação das ligações cruzadas (cross-link).

**Conclusões**

## V CONCLUSÕES

Com base no conjunto de dados obtidos dos diferentes métodos analisados, o cross-link químico, quando em pH igual a 8 e velocidade de agitação de 380 rpm, apresentou um protocolo simples, rápido, barato, altamente reprodutível, com melhor incorporação da AICIPc ou nanopartículas magnéticas e menor consumo de reagente, apresentaram diâmetro médio de aproximadamente 200 nm; índice de polidispersividade de 0,100 e potencial zeta de -40 mV.

As análises de morfologia de superfície das NpA foram realizadas utilizando-se Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e Microscopia de Força Atômica (MFA), e permitiram concluir que o método do cross-link químico na presença de glutaraldeído é mais indicada para o preparo das nanopartículas de albumina, tendo em vista que apresentaram partículas altamente estáveis e monodispersas, com formato esférico e elevada homogeneidade no diâmetro médio, o qual foi equivalente a aproximadamente 200 nm. Em geral, tanto o MEV quando o MFA corroboraram com os dados obtidos no equipamento Zetasizer.

Entretanto, as análises de morfologia de superfície das NpA incorporadas com nanopartículas magnéticas indicaram a presença de estruturas mais aglomerados, devido a atração eletrostática das mesmas.

Os Estudos, *in vitro*, com linhagens U87MG indicaram que as NpA vazias em diferentes concentrações não causaram morte celular significativa das células, bem como as tratadas com AICIPc livre, isso pois, a AICIPc livre não adentra para o meio intracelular por não possuir meios para transpor a membrana, com isso, foi possível confirmar que as NpA podem ser consideradas carreadores da AICIPc para o meio intracelular. Quando dentro da célula, essas NpA sofrem o processo de degradação proteolítica com consequente liberação da AICIPc, a qual passa a apresentar uma toxicidade significativa para célula quando na presença do laser, causando, portanto, a morte celular.

Ao observar os dados obtidos através do MTT utilizando NpA preparadas tanto com glutaraldeído quanto com gliceraldeído, em diferentes concentrações de AICIPc, é possível comprovar que na ausência de luz não apresentaram morte celular significativa. Entretanto, ao aplicar o laser foi possível observar morte celular significativa para as intensidades de 350 e 700 mJ ao tratar com NpA (glutaraldeído) e apenas para 700 mJ ao tratar com NpA (gliceraldeído). Portanto, é possível comprovar que para ambas as nanopartículas a



concentração de 0,5 uM de AlClPc e 700 mJ de intensidade apresentam resultados promissores para o tratamento de glioblastoma multiforme.

Igualmente, quando incorporadas com Pc e/ou nanopartículas magnéticas, as NpA apresentaram morte celular significativa na presença de ambas, indicando resultados promissores para o tratamento de gliomas usando terapia fotodinâmica e hipertermia.

Portanto, os dados obtidos nesta dissertação de mestrado sugerem que o desenvolvimento das nanopartículas a base de albumina permitirá, no futuro, a disponibilidade de uma nova estratégia terapêutica de baixo custo para tratamento de doenças que acometem principalmente o SNC.



**Referências**  
**Bibliográficas**

## VI REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINIS, C.; BOSSI, F.; MASAT, E.; RADILLO, O.; TONON, M.; DE, S. F.; TEDESCO, F.; BULLA, R. MBL interferes with endovascular trophoblast invasion in pre-eclampsia, *Clin. Dev. Immunol.*, v. 2012, p. 484321, 2012.
- AI, X.; HO, C. J. H.; AW, J.; ATTIA, A. B. E.; MU, J.; WANG, Y.; WANG, X.; WANG, Y.; LIU, X.; CHEN, H. In vivo covalent cross-linking of photon-converted rare-earth nanostructures for tumour localization and theranostics, *Nature communications*, v. 7, 2016.
- ALIAKBARSHIRAZI, S.; TALEBIAN, A. Electrospun gelatin nanofibrous scaffolds for cartilage tissue engineering, *Materials Today: Proceedings*, v. 4, p. 7059-7064, 2017.
- AN, F. F.; ZHANG, X. H. Strategies for Preparing Albumin-based Nanoparticles for Multifunctional Bioimaging and Drug Delivery, *Theranostics*, v. 7, p. 3667, 2017.
- AZEVEDO, A. F.; FERREIRA, N. G. Filmes de nanodiamantes para aplicações em sistemas eletroquímicos e tecnologia aeroespacial, *Qu+mica Nova*, v. 29, p. 129, 2006.
- BERNARDI, A.; BRAGANHOL, E.; J+ÑGER, E. z.; FIGUEIR+!, F. c.; EDELWEISS, M. I.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. I. S.; BATTASTINI, A. M. Indomethacin-loaded nanocapsules treatment reduces in vivo glioblastoma growth in a rat glioma model, *Cancer letters*, v. 281, p. 53-63, 2009.
- BREGOLI, L.; MOVIA, D.; GAVIGAN-IMEDIO, J. D.; LYSAGHT, J.; REYNOLDS, J.; PRINA-MELLO, A. Nanomedicine applied to translational oncology: a future perspective on cancer treatment, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 12, p. 81-103, 2016.
- CALERO, M.; GUTI+@RREZ, L. a.; SALAS, G.; LUENGO, Y.; L+ÍZARO, A.; ACEDO, P.; MORALES, M. P.; MIRANDA, R.; VILLANUEVA, A. Efficient and safe internalization of magnetic iron oxide nanoparticles: two fundamental requirements for biomedical applications, *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, v. 10, p. 733-743, 2014.
- CALIXTO, G. M. F.; BERNEGOSI, J.; DE FREITAS, L. M.; FONTANA, C. R.; CHORILLI, M. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review, *Molecules*, v. 21, p. 342, 2016.
- CALORI, I. R.; TEDESCO, A. C. Lipid vesicles loading aluminum phthalocyanine chloride: Formulation properties and disaggregation upon intracellular delivery, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 160, p. 240-247, 2016.
- CHEUNG, D. T.; NIMNI, M. E. Mechanism of crosslinking of proteins by glutaraldehyde I: reaction with model compounds, *Connective tissue research*, v. 10, p. 187-199, 1982.
- CICILLINI, S. A.; PRAZIAS, A. C. L.; TEDESCO, A. C.; SERRA, O. A.; DA SILVA, R. S. Nitric oxide and singlet oxygen photo-generation by light irradiation in the phototherapeutic window of a nitrosyl ruthenium conjugated with a phthalocyanine rare earth complex, *Polyhedron*, v. 28, p. 2766-2770, 2009.

- DADPARVAR, M.; WAGNER, S.; WIEN, S.; KUFLEITNER, J.; WOREK, F.; VON BRIESEN, H.; KREUTER, J. HI 6 human serum albumin nanoparticles- Development and transport over an in vitro blood-brain barrier model, *Toxicology letters*, v. 206, p. 60-66, 2011.
- DADPARVAR, M.; WAGNER, S.; WIEN, S.; WOREK, F.; VON BRIESEN, H.; KREUTER, J. +. Freeze-drying of HI-6-loaded recombinant human serum albumin nanoparticles for improved storage stability, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, v. 88, p. 510-517, 2014.
- DAN, M.; SCOTT, D. F.; HARDY, P. A.; WYDRA, R. J.; HILT, J. Z.; YOKEL, R. A.; BAE, Y. Block copolymer cross-linked nanoassemblies improve particle stability and biocompatibility of superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Pharmaceutical research*, v. 30, p. 552-561, 2013.
- DE MEJIA, E. G.; BRADFORD, T.; HASLER, C. The anticarcinogenic potential of soybean lectin and lunasin, *Nutrition reviews*, v. 61, p. 239-246, 2003.
- DE PAULA, C. S.; TEDESCO, A. C.; PRIMO, F. L.; VILELA, J. M.; ANDRADE, M. S.; MOSQUEIRA, V. C. Chloroaluminium phthalocyanine polymeric nanoparticles as photosensitisers: photophysical and physicochemical characterisation, release and phototoxicity in vitro, *Eur. J. Pharm. Sci.*, v. 49, p. 371-381, 2013.
- 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, 2015.
- DOUGHERTY, T. J.; GOMER, C. J.; HENDERSON, B. W.; JORI, G.; KESSEL, D.; KORBELIK, M.; MOAN, J.; PENG, Q. Photodynamic therapy, *Journal of the National Cancer Institute*, v. 90, p. 889-905, 1998.
- DREIS, S.; ROTHWEILER, F.; MICHAELIS, M.; CINATL, J.; KREUTER, J. +.; LANGER, K. Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 341, p. 207-214, 2007.
- EFFERTH, T.; SCH+ÄTTLER, U.; KRISHNA, S.; SCHMIEDEK, P.; WENZ, F.; GIORDANO, F. A. Hepatotoxicity by combination treatment of temozolomide, artesunate and Chinese herbs in a glioblastoma multiforme patient: case report review of the literature, *Archives of toxicology*, v. 91, p. 1833-1846, 2017.
- 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.
- FANG, R.; TANAKA, K.; MUDHIVARTHI, V.; BOGNER, R. H.; PIKAL, M. J. Effect of Controlled Ice Nucleation on Stability of Lactate Dehydrogenase during Freeze-Drying, *Journal of pharmaceutical sciences* 2017.
- FERREIRA, D. C.; MONTEIRO, C. S.; CHAVES, C. R.; S+ÍFAR, G. A.; MOREIRA, R. L.; PINHEIRO, M. c. V.; MARTINS, D. C.; LADEIRA, L. O.; KRAMBROCK, K.

- Hybrid systems based on gold nanostructures and porphyrins as promising photosensitizers for photodynamic therapy, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 150, p. 297-307, 2017.
- FERREIRA, M.; SAGA, Y.; ALUICIO-SARDUY, E.; TEDESCO, A. C. Chitosan nanoparticles for melanoma cancer treatment by photodynamic therapy and electrochemotherapy using aminolevulinic acid derivatives, *Current medicinal chemistry*, v. 20, p. 1904-1911, 2013.
- FONSECA ROLANDO ALBERTO, R.; JOAO, R.; MARIA DE LOS ANGELES, M.-F.; MUNOZ ALBERTO, M.; VAZQUEZ MANUEL JONATHAN, F.; BASURTO JOSE, C. Principal physicochemical methods used to characterize dendrimer molecule complexes used as genetic therapy agents, nanovaccines or drug carriers, *Current Pharmaceutical Design*, v. 23, p. 3076-3083, 2017.
- FREITAS, S.; MERKLE, H. P.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology, *Journal of controlled release*, v. 102, p. 313-332, 2005.
- FRUCHON, S.; POUPOT, R. Pro-Inflammatory Versus Anti-Inflammatory Effects of Dendrimers: The Two Faces of Immuno-Modulatory Nanoparticles, *Nanomaterials*, v. 7, p. 251, 2017.
- GALINDO-GONZALEZ, C.; GANTZ, S.; OURRY, L.; MAMMERI, F.; AMMAR-MERAH, S.; PONTON, A. Elaboration and rheological investigation of magnetic sensitive nanocomposite biopolymer networks, *Macromolecules*, v. 47, p. 3136-3144, 2014.
- GALLEGO- GÓMEZ, F.; QUINTANA, J. A.; VILLALVILLA, J. M.; DÍAZ-GARCÍA, M. A.; MARTÍN-GOMIS, L.; FERNÁNDEZ-LÁZARO, F.; SASTRE-SANTOS, Á. Phthalocyanines as Efficient Sensitizers in Low-T g Hole-Conducting Photorefractive Polymer Composites, *Chemistry of Materials*, v. 21, p. 2714-2720, 2009.
- Gerrard Juliet A. e Paula K. Brown. **Protein Cross-Linking in Food: Mechanisms, Consequences, Applications**, Elsevier, 2002. 211-215.
- GHOSH, P.; ROY, A. S.; CHAUDHURY, S.; JANA, S. K.; CHAUDHURY, K.; DASGUPTA, S. Preparation of albumin based nanoparticles for delivery of fisetin and evaluation of its cytotoxic activity, *International journal of biological macromolecules*, v. 86, p. 408-417, 2016.
- GHUMAN, J.; ZUNSZAIN, P. A.; PETITPAS, I.; BHATTACHARYA, A. A.; OTAGIRI, M.; CURRY, S. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin, *Journal of molecular biology*, v. 353, p. 38-52, 2005.
- Haley Barbara e Eugene Frenkel. **Nanoparticles for Drug Delivery in Cancer Treatment**, Elsevier, 2008. 57-64.
- HANIF, F.; MUZAFFAR, K.; PERVEEN, K.; MALHI, S. M.; SIMJEE, S. U. Glioblastoma multiforme: A review of its epidemiology and pathogenesis through clinical presentation and treatment, *Asian Pacific journal of cancer prevention: APJCP*, v. 18, p. 3, 2017.

- HORN, J.; FRIESS, W. Detection of Collapse and Crystallization of Saccharide, Protein and Mannitol Formulations by Optical Fibers in Lyophilization, *Frontiers in Chemistry*, v. 6, p. 4, 2018.
- HORODYCKID, C.; CANNEY, M.; VIGNOT, A.; BOISGARD, R.; DRIER, A. I.; HUBERFELD, G.; FRANÇOIS, C.; PRIGENT, A.; SANTIN, M. D.; ADAM, C. Safe long-term repeated disruption of the blood-brain barrier using an implantable ultrasound device: a multiparametric study in a primate model, *Journal of neurosurgery*, v. 126, p. 1351-1361, 2017.
- HUANG, Z.; XU, H.; MEYERS, A. D.; MUSANI, A. I.; WANG, L.; TAGG, R.; BARQAWI, A. B.; CHEN, Y. K. Photodynamic therapy for treatment of solid tumors – potential and technical challenges, *Technology in cancer research & treatment*, v. 7, p. 309-320, 2008.
- ISHWARYA, S. P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; STAPLEY, A. G. F. Spray-freeze-drying: A novel process for the drying of foods and bioproducts, *Trends in Food Science & Technology*, v. 41, p. 161-181, 2015.
- 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.
- JAHANSHAHI, M.; BABAEI, Z. Protein nanoparticle: a unique system as drug delivery vehicles, *African Journal of Biotechnology*, v. 7, 2008.
- JUN, J. Y.; NGUYEN, H. H.; CHUN, H. S.; KANG, B. C.; KO, S. Preparation of size-controlled bovine serum albumin (BSA) nanoparticles by a modified desolvation method, *Food Chemistry*, v. 127, p. 1892-1898, 2011.
- KIM, M. H.; SON, H. Y.; KIM, G. Y.; PARK, K.; HUH, Y. M.; HAAM, S. Redoxable heteronanocrystals functioning magnetic relaxation switch for activatable T<sub>1</sub> and T<sub>2</sub> dual-mode magnetic resonance imaging, *Biomaterials*, v. 101, p. 121-130, 2016.
- KINOSHITA, R.; ISHIMA, Y.; CHUANG, V. T.; NAKAMURA, H.; FANG, J.; WATANABE, H.; SHIMIZU, T.; OKUHIRA, K.; ISHIDA, T.; MAEDA, H. Improved anticancer effects of albumin-bound paclitaxel nanoparticle via augmentation of EPR effect and albumin-protein interactions using S-nitrosated human serum albumin dimer, *Biomaterials*, v. 140, p. 162-169, 2017.
- KOBAYASHI, T.; ITO, A.; HONDA, H. Magnetic Nanoparticle-Mediated Hyperthermia and Induction of Anti-Tumor Immune Responses. In: **Hyperthermic Oncology from Bench to Bedside**. Springer, 2016. p. 137-150.
- KUDARHA, R. R.; SAWANT, K. K. Albumin based versatile multifunctional nanocarriers for cancer therapy: Fabrication, surface modification, multimodal therapeutics and imaging approaches, *Materials Science and Engineering: C* 2017.
- KUMAR, C. S.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery, *Advanced drug delivery Reviews*, v. 63, p. 789-808, 2011.

- 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.
- LAURENT, S.; DUTZ, S.; HERNÁNDEZ, U. O.; MAHMOUDI, M. Magnetic fluid hyperthermia: focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles, *Advances in colloid and interface science*, v. 166, p. 8-23, 2011.
- LI, F.; ZHENG, C.; XIN, J.; CHEN, F.; LING, H.; SUN, L.; WEBSTER, T. J.; MING, X.; LIU, J. Enhanced tumor delivery and antitumor response of doxorubicin-loaded albumin nanoparticles formulated based on a Schiff base, *International journal of nanomedicine*, v. 11, p. 3875, 2016.
- LI, Y.; LIU, C.; TAN, Y.; XU, K.; LU, C.; WANG, P. In situ hydrogel constructed by starch-based nanoparticles via a Schiff base reaction, *Carbohydrate Polymers*, v. 110, p. 87-94, 2014.
- LI, Z.; XIAO, M.; WANG, J.; NGAI, T. Pure protein scaffolds from pickering high internal phase emulsion template, *Macromolecular rapid communications*, v. 34, p. 169-174, 2013.
- LIANG, C.; YANG, Y.; LING, Y.; HUANG, Y.; LI, T.; LI, X. Improved therapeutic effect of folate-decorated PLGA-PEG nanoparticles for endometrial carcinoma, *Bioorganic & medicinal chemistry*, v. 19, p. 4057-4066, 2011.
- LIMA, F. R.; KAHN, S. A.; SOLETTI, R. C.; BIASOLI, D.; ALVES, T.; DA FONSECA, A. C.; GARCIA, C.; ROMERO, L.; BRITO, J.; HOLANDA-AFONSO, R. Glioblastoma: therapeutic challenges, what lies ahead, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer*, v. 1826, p. 338-349, 2012.
- LIN, T.; ZHAO, P.; JIANG, Y.; TANG, Y.; JIN, H.; PAN, Z.; HE, H.; YANG, V. C.; HUANG, Y. Blood-brain-barrier-penetrating albumin nanoparticles for biomimetic drug delivery via albumin-binding protein pathways for antiglioma therapy, *ACS nano*, v. 10, p. 9999-10012, 2016.
- LIU, T. M.; CONDE, J.; LIPIŃSKI, T.; BEDNARKIEWICZ, A.; HUANG, C. C. Revisiting the classification of NIR-absorbing/emitting nanomaterials for in vivo bioapplications, *NPG Asia Materials*, v. 8, p. e295, 2016.
- LOUIS, D. N.; OHGAKI, H.; WIESTLER, O. D.; CAVENEE, W. K.; BURGER, P. C.; JOUVET, A.; SCHEITHAUER, B. W.; KLEIHUES, P. The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system, *Acta neuropathologica*, v. 114, p. 97-109, 2007.
- LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy, *Chemical reviews*, v. 115, p. 1990-2042, 2015.
- MISRA, R.; ACHARYA, S.; SAHOO, S. K. Cancer nanotechnology: application of nanotechnology in cancer therapy, *Drug Discovery Today*, v. 15, p. 842-850, 2010.

- MO, Y.; BARNETT, M. E.; TAKEMOTO, D.; DAVIDSON, H.; KOMPELLA, U. B. Human serum albumin nanoparticles for efficient delivery of Cu, Zn superoxide dismutase gene, *Molecular vision*, v. 13, p. 746, 2007.
- MORET, F.; REDDI, E. Strategies for optimizing the delivery to tumors of macrocyclic photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT), *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, v. 21, p. 239-256, 2017.
- MOURA, M. P. d. S. **Nanocarreadores contendo ftalocianina de cloroaluminio: desenvolvimento, caracterização físico-química e avaliação in vitro da fotocitotoxicidade em melanoma.** 2011. Universidade de São Paulo, 2011.
- MUEHLMANN, L. A.; MA, B. C.; LONGO, J. P. F.; SANTOS, M. d. F. M. A.; AZEVEDO, R. B. Aluminum phthalocyanine chloride associated to poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) nanoparticles as a new third-generation photosensitizer for anticancer photodynamic therapy, *International journal of nanomedicine*, v. 9, p. 1199, 2014.
- NOBILE, S.; NOBILE, L. Nanotechnology for biomedical applications: Recent advances in neurosciences and bone tissue engineering, *Polymer Engineering & Science* 2017.
- NOORANI, L.; STENZEL, M.; LIANG, R.; POURGHOLAMI, M. H.; MORRIS, D. L. Albumin nanoparticles increase the anticancer efficacy of albendazole in ovarian cancer xenograft model, *Journal of nanobiotechnology*, v. 13, p. 25, 2015.
- ORYAN, A.; KAMALI, A.; MOSHIRI, A.; BAHARVAND, H.; DAEMI, H. Chemical crosslinking of biopolymeric scaffolds: Current knowledge and future directions of crosslinked engineered bone scaffolds, *International journal of biological macromolecules*, v. 107, p. 678-688, 2018.
- PARANJPE, M.; MULLER-GOYMANN, C. C. Nanoparticle-mediated pulmonary drug delivery: a review, *Int. J. Mol. Sci.*, v. 15, p. 5852-5873, 2014.
- PATEL, S.; SRIVASTAVA, S.; SINGH, M. R.; SINGH, D. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing, *International journal of biological macromolecules* 2017.
- PATTEKARI, P.; ZHENG, Z.; ZHANG, X.; LEVCHENKO, T.; TORCHILIN, V.; LVOV, Y. Top-down and bottom-up approaches in production of aqueous nanocolloids of low solubility drug paclitaxel, *Physical Chemistry Chemical Physics*, v. 13, p. 9014-9019, 2011.
- PIMENTEL, L. F.; JACOME JÚNIOR, A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 43, p. 503-514, 2007.
- POURMEHRAN, O.; GORJI, T. B.; GORJI-BANDPY, M. Magnetic drug targeting through a realistic model of human tracheobronchial airways using computational fluid and particle dynamics, *Biomechanics and modeling in mechanobiology*. 1-20, 2016.



- PRABHU, R. H.; PATRAVALE, V. B.; JOSHI, M. D. Polymeric nanoparticles for targeted treatment in oncology: current insights, *International journal of nanomedicine*, v. 10, p. 1001, 2015.
- PRIMO, F. L.; DE PAULA, L. B.; DE SIQUEIRA-MOURA, M. P.; TEDESCO, A. C. Photobiostimulation on wound healing treatment by CIAIPc-nanoemulsion from a multiple-wavelength portable light source on a 3D-human stem cell dermal equivalent, *Current medicinal chemistry*, v. 19, p. 5157-5163, 2012.
- PRIMO, F. L.; RODRIGUES, M. M.; SIMIONI, A. R.; LACAVALA, Z. G.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Photosensitizer-loaded magnetic nanoemulsion for use in synergic photodynamic and magnetohyperthermia therapies of neoplastic cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, v. 8, p. 5873-5877, 2008.
- ROBINSON, M.; LEE, B. Y.; LEONENKO, Z. Drugs and Drug Delivery Systems Targeting Amyloid- $\beta$  in Alzheimers Disease, *arXiv preprint arXiv:1704. 08313* 2017.
- ROGER, S. p.; SANG, Y. Y. C.; BEE, A. s.; PERZYNSKI, R. +.; DI MEGLIO, J. M.; PONTON, A. Structural and multi-scale rheophysical investigation of diphasic magneto-sensitive materials based on biopolymers, *The European Physical Journal E*, v. 38, p. 88, 2015.
- ROSSI-BERGMANN, B. A nanotecnologia: da saúde para além do determinismo tecnológico, *Ciência e Cultura*, v. 60, p. 54-57, 2008.
- ROY, I.; OHULCHANSKY, T. Y.; PUDAVALA, H. E.; BERGEY, E. J.; OSEROFF, A. R.; MORGAN, J.; DOUGHERTY, T. J.; PRASAD, P. N. Ceramic-based nanoparticles entrapping water-insoluble photosensitizing anticancer drugs: a novel drug-carrier system for photodynamic therapy, *J. Am. Chem. Soc.*, v. 125, p. 7860-7865, 2003.
- RUAN, C.; LIU, L.; LU, Y.; ZHANG, Y.; HE, X.; CHEN, X.; ZHANG, Y.; CHEN, Q.; GUO, Q.; SUN, T.; JIANG, C. Substance P-modified human serum albumin nanoparticles loaded with paclitaxel for targeted therapy of glioma, *Acta Pharmaceutica Sinica B* 2017.
- RYDZEK, G.; SCHAAF, P.; VOEGEL, J. C.; JERRY, L. c.; BOULMEDAIS, F. Strategies for covalently reticulated polymer multilayers, *Soft Matter*, v. 8, p. 9738-9755, 2012.
- SAILAJA, A.; AMARESHWAR, P.; CHAKRAVARTY, P. Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application, *Int J Pharm Pharm Sci*, v. 3, p. 45-50, 2011.
- SANCHEZ, F.; SOBOLEV, K. Nanotechnology in concrete—a review, *Construction and building materials*, v. 24, p. 2060-2071, 2010.
- SANVICENS, N.; MARCO, M. P. Multifunctional nanoparticles—properties and prospects for their use in human medicine, *Trends in biotechnology*, v. 26, p. 425-433, 2008.
- SARAIVA, C.; PRAÇA, C.; FERREIRA, R.; SANTOS, T.; FERREIRA, L.; BERNARDINO, L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: Overcoming blood–brain barrier to treat neurodegenerative diseases, *Journal of controlled release*, v. 235, p. 34-47, 2016.

- SELBO, P. K.; WEYERGANG, A.; ENG, M. S.; BOSTAD, M.; MAELANDSMO, G. M.; HOGSET, A.; BERG, K. Strongly amphiphilic photosensitizers are not substrates of the cancer stem cell marker ABCG2 and provides specific and efficient light-triggered drug delivery of an EGFR-targeted cytotoxic drug, *Journal of controlled release*, v. 159, p. 197-203, 2012.
- SHIMONI, O.; YAN, Y.; WANG, Y.; CARUSO, F. Shape-dependent cellular processing of polyelectrolyte capsules, *ACS nano*, v. 7, p. 522-530, 2012.
- SIMIONI, A. R.; MARTINS, O. P.; LACAVALA, Z. G. M.; AZEVEDO, R. B.; LIMA, E. C. D.; LACAVALA, B. M.; MORAIS, P. C.; TEDESCO, A. C. Cell toxicity studies of albumin-based nanosized magnetic beads, *Journal of nanoscience and nanotechnology*, v. 6, p. 2413-2415, 2006.
- Siqueira-Moura M. P., F. L. Primo, and A. C. Tedesco. **Photochemotherapeutic Effect of Nanodevices Containing Chloroaluminum Phthalocyanine on Oral Cancer Cell Line**, JOHN WILEY & SONS LTD THE ATRIUM, SOUTHERN GATE, CHICHESTER PO19 8SQ, W SUSSEX, ENGLAND, 2010. 208.
- 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 and Engineering: C*, v. 33, p. 1744-1752, 2013.
- SISSON, K.; ZHANG, C.; FARACH-CARSON, M. C.; CHASE, D. B.; RABOLT, J. F. Evaluation of cross-linking methods for electrospun gelatin on cell growth and viability, *Biomacromolecules*, v. 10, p. 1675-1680, 2009.
- SLIWKA, L.; WIKTORSKA, K.; SUCHOCKI, P.; MILCZAREK, M.; MIELCZAREK, S.; LUBELSKA, K.; CIERPIAŁ, T.; WYWAŁA, P.; KIEBASIAŃSKI, P.; JAROMIN, A. The comparison of MTT and CVS assays for the assessment of anticancer agent interactions, *PloS one*, v. 11, p. e0155772, 2016.
- SON, Y. H.; JUNG, Y.; ROH, H.; LEE, J. K. Enhanced viscoelastic property of iron oxide nanoparticle decorated organoclay fluid under magnetic field, *Nano Convergence*, v. 4, p. 22, 2017.
- TAN, H.; SUN, G.; LIN, W.; MU, C.; NGAI, T. Gelatin particle-stabilized high internal phase emulsions as nutraceutical containers, 2014.
- TRUONG, N. P.; WHITTAKER, M. R.; MAK, C. W.; DAVIS, T. P. The importance of nanoparticle shape in cancer drug delivery, *Expert opinion on drug delivery*, v. 12, p. 129-142, 2015.
- VAN DER VAART, K.; DEPYPERE, F. d. r.; DE GRAEF, V.; SCHALL, P.; FALL, A.; BONN, D.; DEWETTINCK, K. Dark chocolate's compositional effects revealed by oscillatory rheology, *European Food Research and Technology*, v. 236, p. 931-942, 2013.
- VARSHOSAZ, J.; GHAFFARI, S.; KHOSHAYAND, M. R.; ATYABI, F.; DEHKORDI, A. J.; KOBARFARD, F. Optimization of freeze-drying condition of amikacin solid lipid

- nanoparticles using D-optimal experimental design, *Pharmaceutical development and technology*, v. 17, p. 187-194, 2012.
- VON ROEMELING, C.; JIANG, W.; CHAN, C. K.; WEISSMAN, I. L.; KIM, B. Y. Breaking Down the Barriers to Precision Cancer Nanomedicine, *Trends in biotechnology* 2016.
- WEBER, C.; KREUTER, J.; LANGER, K. Desolvation process and surface characteristics of HSA-nanoparticles, *International Journal of Pharmaceutics*, v. 196, p. 197-200, 2000.
- WELLER, M.; CLOUGHESY, T.; PERRY, J. R.; WICK, W. Standards of care for treatment of recurrent glioblastoma—are we there yet?, *Neuro-oncology*, v. 15, p. 4-27, 2012.
- WEN, M. M.; EL-SALAMOUNI, N. S.; EL-REFAIE, W. M.; HAZZAH, H. A.; ALI, M. M.; TOSI, G.; FARID, R. M.; BLANCO-PRIETO, M. J.; BILLA, N.; HANAFY, A. S. Nanotechnology-based drug delivery systems for Alzheimer's disease management: Technical, industrial, and clinical challenges, *Journal of controlled release*, v. 245, p. 95-107, 2017.
- WOLLENSAK, G.; IOMDINA, E. Crosslinking of scleral collagen in the rabbit using glycerinaldehyde, *Journal of Cataract & Refractive Surgery*, v. 34, p. 651-656, 2008.
- WOODS, A.; PATEL, A.; SPINA, D.; RIFFO-VASQUEZ, Y.; BABIN-MORGAN, A.; DE ROSALES, R. T. M.; SUNASSEE, K.; CLARK, S.; COLLINS, H.; BRUCE, K. In vivo biocompatibility, clearance, and biodistribution of albumin vehicles for pulmonary drug delivery, *Journal of controlled release*, v. 210, p. 1-9, 2015.
- WYDRA, R. J.; RYCHAHOU, P. G.; EVERS, B. M.; ANDERSON, K. W.; DZIUBLA, T. D.; HILT, J. Z. The role of ROS generation from magnetic nanoparticles in an alternating magnetic field on cytotoxicity, *Acta biomaterialia*, v. 25, p. 284-290, 2015.
- XU, J.; ZHOU, X.; LI, Y.; TIAN, Y. Cancer Nanotechnology: Recent Trends and Developments in Strategies for Targeting Cancer Cells to Improve Cancer Imaging and Treatment, *Current drug metabolism*, v. 18, p. 266-279, 2017.
- YANG, L.; WANG, C.; CHEN, L.; WANG, X.; CUI, P.; ZHANG, T. Effect of aldehydes crosslinkers on properties of bacterial cellulose-poly (vinyl alcohol)(BC/PVA) nanocomposite hydrogels, *Fibers and Polymers*, v. 18, p. 33-40, 2017.
- YASIR, S. B. M.; SUTTON, K. H.; NEWBERRY, M. P.; ANDREWS, N. R.; GERRARD, J. A. The impact of Maillard cross-linking on soy proteins and tofu texture, *Food Chemistry*, v. 104, p. 1502-1508, 2007.
- YE, L.; PEARSON, T.; CORDEAU, Y.; MEFFORD, O. T.; CRAWFORD, T. M. Triggered self-assembly of magnetic nanoparticles, *Scientific reports*, v. 6, p. 23145, 2016.
- YONG, Y.; ZHOU, L.; ZHANG, S.; YAN, L.; GU, Z.; ZHANG, G.; ZHAO, Y. Gadolinium polytungstate nanoclusters: a new theranostic with ultrasmall size and versatile properties for dual-modal MR/CT imaging and photothermal therapy/radiotherapy of cancer, *NPG Asia Materials*, v. 8, p. e273, 2016.

- ZENSI, A.; BEGLEY, D.; PONTIKIS, C.; LEGROS, C.; MIHOREANU, L.; B++CHEL, C.; KREUTER, J. +. Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein AI cross the blood-brain barrier and enter the rodent brain, *Journal of drug targeting*, v. 18, p. 842-848, 2010.
- ZHANG, G.; LIAO, Y.; BAKER, I. Surface engineering of core/shell iron/iron oxide nanoparticles from microemulsions for hyperthermia, *Materials Science and Engineering: C*, v. 30, p. 92-97, 2010.
- ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: the past and the future, *Advanced drug delivery Reviews*, v. 65, p. 104-120, 2013.
- ZHOU, C. New trends in photobiology: mechanisms of tumor necrosis induced by photodynamic therapy, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, v. 3, p. 299-318, 1989.