

TANIRA VIANA VERÍSSIMO

**AÇÃO DO VERMELHO NEUTRO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE OURO:  
USO POTENCIAL EM TERAPIA FOTODINÂMICA (TFD) PARA CÂNCER**

BRASÍLIA, 2012

TANIRA VIANA VERÍSSIMO

**AÇÃO DO VERMELHO NEUTRO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE OURO:  
USO POTENCIAL EM TERAPIA FOTODINÂMICA DE CÂNCER (TFD)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovada em 18 de dezembro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claire Nain Lunardi Gomes – (presidente)**  
Universidade de Brasília

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziella Anselmo Joanitti**  
Universidade de Brasília

**Prof.Dr. João Paulo Figueiró Longo**  
Universidade de Brasília

TANIRA VIANA VERÍSSIMO

**AÇÃO DO VERMELHO NEUTRO ASSOCIADO À NANOPARTÍCULAS DE OURO:  
USO POTENCIAL EM TERAPIA FOTODINÂMICA DE CÂNCER (TFD)**

Dissertação apresentada como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília

Aprovada em 18 de dezembro de 2012

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Claire Nain Lunardi Gomes – (presidente)  
Universidade de Brasília

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Graziella Anselmo Joanitti  
Universidade de Brasília

Prof.Dr. João Paulo Figueiró Longo  
Universidade de Brasília

Dedico este trabalho a minha mãe. (*in memoriam*).

## AGRADECIMENTO

A Deus, sempre!

Ao meu marido, amigo e amor Samir pelo apoio, carinho, espera, incentivo, por acreditar e sonhar comigo.

A minha amada mãe Maria Assunção (*in memoriam*) pelo exemplo, carinho, dedicação, pela minha educação, pelo amor incondicional. Esse mestrado é dedicado a você, obrigada por sempre ter acreditado em mim.

Ao meu amado pai Roque e sua esposa Marta pelo carinho e respeito. Obrigada sempre.

Aos meus queridos irmãos, Chelon, Mirelle e Felipe que são verdadeiros presentes em minha vida, obrigada pelo companheirismo e por sempre me apoiarem.

Aos meus sogros, cunhados, sobrinhos e toda minha família e amigos pela compreensão nos momentos de ausência.

A querida Jaqueline e todo o laboratório de bionanotecnologia da Universidade de Brasília que ajudaram diretamente na realização desse trabalho meu eterno agradecimento, pois sem eles teria sido muito mais difícil.

A Naiara e Diego pelo apoio em todos os momentos e por terem colaborado tanto com esse estudo.

A todos os amigos e coordenadores do colégio La Salle pelo apoio e compreensão nos momentos de estudo.

As minhas amigas queridas que sempre me apoiaram: Cynara, Kéfine e Sumara.

Aos funcionários da Faculdade Ciências da Saúde da Universidade de Brasília pela assistência.

Ao CAPES, CNPq, FAP-DF e FINATEC pelo suporte financeiro.

A minha orientadora, Professora Claire Nain Lunardi Gomes meu profundo agradecimento pela orientação, incentivo, paciência e por todos os ensinamentos ao longo da realização deste trabalho.

Ao professor Anderson pela orientação e pelos ensinamentos.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
1.1 CÂNCER E NANOTECNOLOGIA.....	16
1.2 NANOPARTÍCULAS EM TERAPIA DE CÂNCER.....	19
1.2.1 Nanopartículas de Ouro.....	20
1.2.2 Revestimento Ácido tioglicólico.....	23
1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA DE CÂNCER (TFD) .....	24
1.3.1 Nanopartículas na TFD.....	28
1.3.2 Fotossensibilizador: Vermelho Neutro .....	29
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.1 OBJETIVO GERAL.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>3 HIPÓTESE</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.1 MATERIAIS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2 MÉTODOS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.1 Purificação e caracterização do Vermelho Neutro. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.2 Preparo das nanopartículas de ouro .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.3 Cálculo do número de moléculas de VN associadas as nanopartículas.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.4 Estudos <i>in vitro</i> . ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.5 Terapia fotodinâmica. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
4.2.6 Análises estatísticas dos experimentos <i>in vitro</i> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1 ESTABILIDADE DAS NANOPARTÍCULAS DE OURO .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.1 Modificação da superfície das AuNP .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>

5.1.2 Perfil espectral de VN, AuNP e AuNPTGA.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.2 Perfil espectral da AuNPTGA na presença ou ausência de citrato excedente. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.3 Determinação dos diâmetros hidrodinâmicos e potencial zeta das nanopartículas .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.1.4 Quantidade de moléculas de VN associadas as AuNP e AuNPTGA.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2 ESTUDOS <i>IN VITRO</i> (VIABILIDADE CELULAR).....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.1 Toxicidade das AuNP e AuNPTGA .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.2 AuNPTGA com e sem citrato avaliação da Citotoxicidade das Nanopartículas. ....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.2.3 Citotoxicidade das AuNPTGA associadas ao fotossensibilizador VN.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3 ESTUDOS DE FOTOTOXICIDADE.....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.1 Avaliação do efeito do LED sobre as linhagens celulares.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
5.3.2 Fototoxicidade do VN, AuNPTGA e AuNPTGA VN 10 µM.	<b>Erro! Indicador não definido.</b>
<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>31</b>
<b>7 REFERÊNCIAS.....</b>	<b>32</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 CÂNCER E NANOTECNOLOGIA

De acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA)(1), o câncer foi amplamente considerado como uma doença de países desenvolvidos com grandes recursos financeiros. Há aproximadamente 40 anos, essa situação vem sendo alterada, e a maior parte dos casos de câncer pode ser observada também em países em desenvolvimento.

Assim, o câncer ganhou uma dimensão maior tornando-se um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que, no ano 2030, podem-se esperar 27 milhões de novos casos incidentes, 17 milhões de mortes e 75 milhões de pessoas portadoras da doença. O maior efeito desse aumento irá incidir em países de baixa e média renda (1).

Apesar de décadas de pesquisa existe ainda uma série de desafios nessa área. É necessário maior eficiência dos agentes anti-cancerígenos, diagnósticos mais precoces e terapêuticas menos agressivas. O desenvolvimento de novos métodos e tecnologias para melhorar a eficiência de entrega de fármacos tem sido um grande foco de pesquisa. Busca-se a modificação nas estruturas dos fármacos para minimizar as limitações decorrentes da natureza hidrofóbica de muitos fármacos anticancerígenos que impedem a utilização nos modos tradicionais de administração (2).

Importantes soluções nas limitações dos fármacos estão sendo realizadas com abordagens nanotecnológicas, tanto que vários carreadores de fármaco nanoestruturados foram aprovados para uso clínico, inclusive para terapias antineoplásicas (3).

A nanotecnologia consiste na habilidade de trabalhar nos níveis atômicos, molecular e supramolecular (na escala de 1-1000 nanômetros (nm)) (4). O desenvolvimento da nanotecnologia tem possibilitado a invenção, caracterização, manipulação, fabricação e utilização de materiais com novas propriedades e funções, resultado do seu tamanho nanométrico (4, 5).



O termo nanotecnologia foi introduzida pelo engenheiro japonês Norio Taniguchi em 1974, designando uma nova tecnologia, que ia além do controle de materiais e da engenharia em microescala. Entretanto, o significado do termo atualmente se aproxima mais da formulação de Eric Drexler, que corresponde à metodologia de processamento envolvendo a manipulação átomo a átomo. A nanociência se refere ao estudo do fenômeno e da manipulação de sistemas físicos que produzam informações significativas, em uma escala conhecida como nano ( $10^{-9}$  m = 1 nm). Assim, a nanotecnologia foca a caracterização, produção e aplicação de sistemas e componentes em nanoescala (6).

A nanotecnologia consiste essencialmente em criar materiais, dispositivos e sistemas com propriedades e aplicações inovadoras. A matéria prima dessa construção são os átomos e moléculas, ou um conjunto deles tais como nanopartículas, nanocamadas, nanofios ou nanotubos. A reorganização da matéria em nanoescala é potencialmente um método econômico de obter funcionalidade para obtenção de produtos com alto valor agregado (7, 5).

A tecnologia de liberação controlada de fármacos representa uma das fronteiras da ciência, a qual envolve diferentes aspectos multidisciplinares e pode contribuir muito para o avanço da saúde humana. Os sistemas de liberação de drogas oferecem inúmeras vantagens quando comparados a outros de administração convencional, como a liberação progressiva e controlada do fármaco, diminuição significativa da toxicidade, e maior tempo de permanência na circulação sanguínea e uma administração segura. O que evita reações inflamatórias locais, permite o uso de doses menores com direcionamento a alvos específicos e ainda a possibilidade de incorporação tanto de substâncias hidrofílicas quanto lipofílicas (8).

Assim, as nanopartículas (NP) podem ser consideradas importantes candidatas para melhorar a eficiência de entrega de fármacos porque elas podem agir como veículos de carga útil para agentes anti-cancerígenos, possibilitando a interação com sistemas biológicos e conseqüentemente a alteração de sua farmacocinética. O uso das NPs explora as vulnerabilidades inerentes dos tumores (9), isso porque os capilares sanguíneos tumorais possuem aberturas com diâmetro entre 200 e 780 nm, assim o uso de NPs com diâmetro entre 100 e 200 nm administrados na corrente sanguínea, passam a ter acesso limitado a tecidos sadios, pois os vasos sanguíneos que os irrigam permitem a passagem geralmente apenas

de partículas menores que 30 nm. Os tecidos tumorais são irrigados por vasos que crescem rapidamente, de forma desordenada e permitem a passagem de partículas com diâmetros de até 400 nm (10). Outro fator importante é a drenagem linfática tumoral ineficiente que aumenta o tempo de permanência das NPs no tecido tumoral (11). Todos esses aspectos descritos estão relacionados com o fenômeno de “permeação e retenção aumentadas” (*Enhanced Permeability and Retention, EPR*), que descreve o acúmulo passivo de nanopartículas em células tumorais(12).

Diversos tipos de NPs inorgânicas têm sido utilizadas no diagnóstico e no tratamento do câncer, entre elas as nanopartículas de ouro, de prata e as nanopartículas magnéticas e também nanopartículas poliméricas, como as micelas e quitosana, nanopartículas lipídicas sólidas, lipossomas, existem também os nanotubos de carbono, os pontos quânticos e as combinações dessas NPs.

Na figura a seguir estão representadas algumas nanopartículas utilizadas em tratamentos (13).

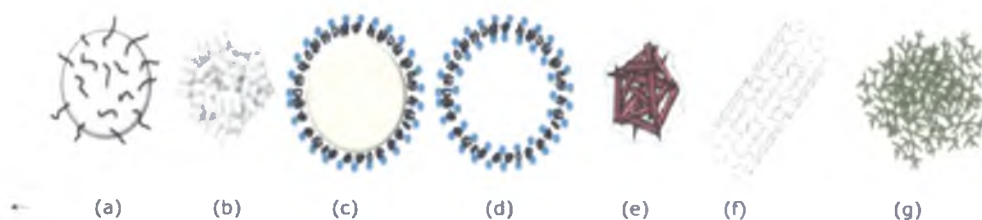


Figura 1: Modelos esquemáticos de nanopartículas utilizadas em terapias: (a) nanopartículas inorgânicas; (b) nanopartículas poliméricas; (c) nanopartículas lipídicas sólidas; (d) lipossomas; (e) nanocristais ou pontos quânticos; (f) nanotubos de carbono e (g) dendrímeros (13).

## 1.2 NANOPARTÍCULAS EM TERAPIA DE CÂNCER

Para um efeito eficiente de um fármaco contra o câncer é necessário a superação de algumas barreiras fisiológicas e bioquímicas, entre elas a resistência do tumor à droga, distribuição, biotransformação e uma boa excreção e inativação da droga no organismo. Atualmente as terapias mais utilizadas possuem efeitos colaterais bem definidos, pois as drogas apresentam toxicidade tanto para células normais, quanto para células tumorais (14).

Nos tecidos tumorais, a baixa vascularização dos tumores diminui o acesso da droga, impedindo o efeito citotóxico nas células. A diferença de pH do ambiente tumoral, a alta pressão intersticial e baixa pressão microvascular são outros fatores de resistência que adiam ou dificultam a entrada de moléculas na região tumoral.

Outro fator em evidência é o MDR (do inglês "multidrug resistance"), fato comum na quimioterapia, em que as drogas são retiradas das células, basicamente por causa da superexpressão de uma proteína da membrana plasmática denominada P-glicoproteína, a qual transporta de forma inespecífica diferentes moléculas para fora da célula (15, 16).

A associação de drogas em sistemas coloidais, os carreadores de drogas, vêm sendo uma grande alternativa na superação desses mecanismos de resistência celular e ampliação da seletividade da droga para células tumorais, amenizando os efeitos colaterais. Uma das formas de superar os mecanismos de resistência às drogas é a adsorção destas em nanopartículas de diferentes materiais, como poliaquilcianoacrilatos, óxido de titânio e sílica gel (17-19).

A biodistribuição das NPs depende da constituição dos capilares sanguíneos nos órgãos e tecidos, do veículo de administração, do tamanho e das características da superfície das NPs (20). O acúmulo específico de drogas em determinados tumores é devido a diferentes propriedades das superfícies das NPs, ocorrendo preferencialmente em órgãos reticuloendoteliais, o que minimiza a permanência destas na circulação sanguínea, a baixa hidrofilicidade pode provocar o aumento da droga em tumores sólido como o melanoma (20, 19). A difusão das NPs nos tecidos, associação, interiorização e distribuição nas células são fatores imprescindíveis na terapia de câncer e diagnóstico (21)

Como citado anteriormente, não é apenas o tamanho um fator relevante nas NPs, mas a modificação da superfície representa uma grande possibilidade de aumentar sua permanência na circulação, melhorar sua interação com células e extinguir os mecanismos de resistência às drogas. As nanopartículas de ouro, por exemplo, para atuarem de forma ativa em terapias químicas, precisam ser funcionalizadas por ligantes como anticorpos, DNA, folato entre outros, para que reconheçam de forma precisa as células tumorais (22)

### 1.2.1 Nanopartículas de Ouro

As nanopartículas de ouro (Figura 2) possuem especial aplicação no diagnóstico do câncer, podendo identificar tumores internos mais cedo, de forma mais eficiente e detalhada do que os métodos usados até agora. É um metal inerte, por isso também o grande uso na medicina (23-27).

Recentemente foram empregadas sondas de alto desempenho à base de nanopartículas de ouro para detecção de células de câncer. As NPs permitiram a imobilização mais fácil e eficiente do anticorpo (Cetuximab), que pode interagir com o receptor fator de crescimento epidérmico seletivamente, sobre a superfície do câncer. Depois da conjugação do Cetuximab com as NPs, uma sonda conjugada ao Cetuximab com um detector de células tumorais detectou imediatamente o fator de crescimento epidérmico expresso de forma elevada em células, A431, relacionadas ao câncer epitelial com até 54 vezes mais especificidade e sensibilidade em comparação a detecção do fator de crescimento em células MCF-7 de câncer de mama humano deficiente em receptores seletivos (28).

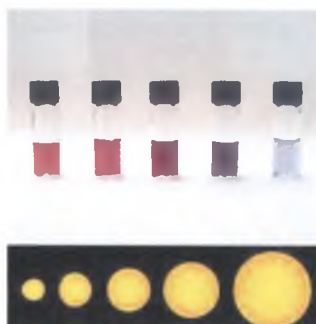


Figura 2: Ilustra a variação da coloração das soluções em relação ao tamanho relativo das nanopartículas de ouro. (Imagem retirada do site <http://scienceblogs.com.br>.)

O que torna o ouro realmente especial é a notável propriedade da superfície de suas nanopartículas. Em nanoescala, um grande número de átomos estão concentrados na superfície das nanopartículas, desempenhando um papel importante na sua composição química e propriedades físicas. De fato, os átomos de sua superfície parecem exibir valência incompleta, no sentido que estão ligados apenas aos átomos internos, mantendo assim locais externos disponíveis para interagir como doador e receptor de espécies, ou ligantes. Por esta razão, as nanopartículas do metal podem apresentar um comportamento semelhante ao dos respectivos complexos de metal, formando ligações químicas seletivas com ligantes adequados (29).

A grande vantagem de se trabalhar com o ouro consiste no fato desse metal possuir uma excelente biocompatibilidade e uma síntese relativamente simples, sendo possível controlar o tamanho das NPs de diversas maneiras. Outro fator é a facilidade da alteração química da sua superfície e na sua caracterização devido a presença de uma banda de *plasmon* de superfície ressonante (30). O modelo físico aplicado na compreensão da interação da luz com as partículas é baseado no comportamento desses plasmons de superfície. Esse fenômeno pode ser compreendido como uma onda proveniente da oscilação coletiva das cargas em um dado meio; e corresponde à oscilação dos elétrons da superfície dos metais(14).

As variações no tamanho e na morfologia provocadas pelas variáveis de síntese provocam um deslocamento da banda *plasmon* para maiores ou menores comprimentos de onda. Esse deslocamento pode ser verificado facilmente através de espectroscopia UV-Vis (31).

Por meio da influência da radiação eletromagnética, os elétrons dos átomos da superfície podem facilmente mover através dos orbitais vazios. As oscilações coerente desses elétrons em ressonância com a frequência da luz dá origem a *plasmons* de superfície, que podem ser exploradas numa vasta gama de aplicações em química, biologia e nanotecnologia(32).

Como no fenômeno de ressonância *plasmon* de superfície os elétrons livres ficam oscilando sobre a superfície metálica, se a nanopartícula for muito menor do que o comprimento de onda da luz, um campo eletromagnético em certa frequência induz uma ressonância, de acordo com a oscilação dos elétrons. Nos metais nobres

a ressonância ocorre na região do visível. Essa oscilação gera um aumento na absorção da radiação (30).

A banda do espectro é resultado da perda de coerência dos elétrons que permite a excitação em uma faixa maior de energias. Para o ouro, a ressonância ocorre por volta de 2,38 eV (520 nm) para partículas próximas a 20 nm de diâmetro e essa faixa se altera conforme o tamanho da NP.

A maioria das aplicações requerem a estabilização das nanopartículas como dispersões coloidais, por meio de modificação da superfície com espécies adequadas de coordenação, tais como íons de citrato, tióis ou surfactantes.(33)

As partículas metálicas desprovidas de moléculas passivantes, que formam uma camada capaz de estabilizar a partícula, podem agregar umas as outras. Para tanto, o uso de nanopartículas de ouro com passivantes torna-se indispensável para atender as técnicas de tratamento químico.

A funcionalização das AuNPs pode ser realizada por uma infinidade de moléculas em sua superfície. Em estudo, Ghosh e colaboradores (34) apresentaram um exemplo de AuNP funcionalizada com tetraetilenoglicol e com um ligante fluorogênico (TTMA), para emissão de sinal de fluorescência com a liberação da droga. Eles observaram que a natureza catiônica do TTMA facilitou a passagem pela barreira da membrana celular e o agente fluorogênico simulou o mecanismo de entrega da droga (34).

Assim, as AuNPs são indiscutivelmente interessantes pois apresentam uma baixa toxicidade intrínseca, suas propriedades de absorção de energia e conversão em calor podem facilmente ser otimizadas em função da forma e tamanho e sua propriedade de *plasmon* as tornam excelentes agentes de contraste para imageamento biológico(22).

### 1.2.2 Revestimento Ácido tioglicólico

Foi proposto a modificação da superfície das AuNPs pela adição de ácido tioglicólico (TGA), fórmula estrutural apresentada na Figura 3. Essa formulação tem a pretensão de manter o tamanho reduzido das nanopartículas e impedir ou diminuir a aglomeração entre as partículas metálicas.

O ácido tioglicólico foi utilizado em nanopartículas de prata esféricas com um diâmetro de cerca de 17 nm preparados por uma reação simples. As nanopartículas de prata obtidas foram uniformes e mostrou pouca variação em seus tamanhos. Este colóide de prata pode manter-se estável durante várias semanas, o que é conveniente para utilização clínica (35).

O ácido tioglicólico é um mercapto derivado. A interação com a superfície do ouro nanoparticulado ocorre através do átomo de enxofre presente na substância. No presente estudo visa utilizar as nanopartículas para o uso da Terapia Fotodinâmica (TFD) como técnica no uso clínico de combate ao câncer e o revestimento com o TGA tem o interesse de carrear mais fármaco, diminuir a toxicidade e promover uma liberação gradual e direcionada da droga.

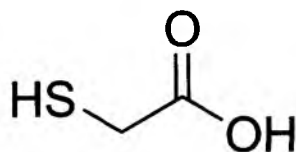


Figura 3: Fórmula estrutural do ácido tioglicólico (TGA) a ser utilizado no revestimento das nanopartículas de ouro.

### 1.3 TERAPIA FOTODINÂMICA DE CÂNCER (TFD)

A Terapia Fotodinâmica (TFD) é uma modalidade terapêutica que combina luz visível de um fármaco sensível à luz (fotossensibilizador) e oxigênio. A associação destes 3 componentes conduzem à produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) que inativam as células tumorais. A TFD no tratamento do câncer é um procedimento clínico recente, porém em outras terapêuticas como a degeneração macular da retina, psoríase, artrite reumatóide sistêmica, restenoses, micoses fungóides, infestações bacterianas, verrugas, arteriosclerose seu uso já é bastante difundido. (36-38)

Essa técnica tem como base a fotooxidação dos compostos biológicos no tecido alvo. É imprescindível o uso de um fotossensibilizador (FS), que seja capaz de gerar espécies tóxicas (como oxigênio singlete;  $^1O_2$ ) ao receber irradiação luminosa no tecido a ser tratado (Figura.4). Existem FS naturais em células e tecidos, mas no emprego da TFD, eles devem ser inseridos no organismo como primeiro passo do tratamento. Em grande parte das aplicações, essas drogas são injetadas na corrente sanguínea do paciente e percorrem todo o corpo, concentrando-se nas células tumorais até 20 vezes mais que nas células saudáveis (37).

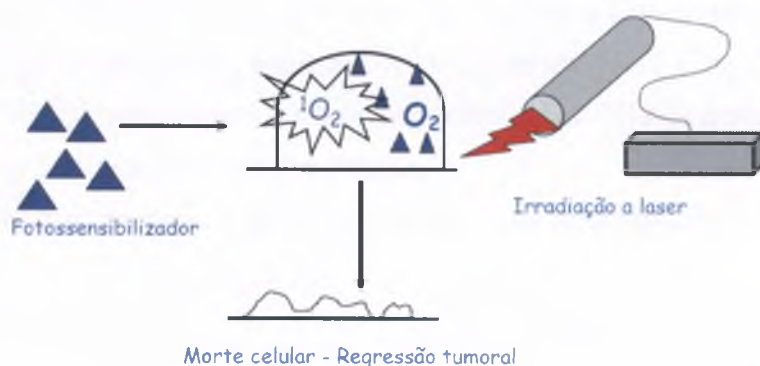


Figura 4: Representação do funcionamento da TFD. Aplica-se o fotossensibilizador no tecido tumoral, onde, após receber irradiação luminosa, a energia é transferida para oxigênio molecular, produzindo espécies tóxicas que podem levar a células tumorais à morte (14).

Para a utilização do FS na TFD este deve apresentar características como a baixa toxicidade no escuro, fotossensibilidade reduzida, facilidade na formulação,



farmacocinética, manuseio simples, fácil obtenção em escala industrial, facilidade na análise dos componentes e possuir alta afinidade de penetração no tecido (39).

De forma geral, os FS têm sido separados em gerações de acordo com o período de desenvolvimento. Os fármacos de primeira geração, foram desenvolvidos no final da década de 60, os de segunda geração na década de 90, e, ainda, os de terceira geração, que se referem a associações terapêuticas entre FS e outras terapias, como imunoterapia e radioterapia (40) e os baseados em plataformas nanotecnológicas surgidos há apenas duas décadas (9). Os sistemas nanoestruturados possibilitam entre outras vantagens a prolongação do tempo de circulação no sangue, a minimização da degradação do FS após a administração e mantém ainda a possibilidade de conservar a atividade do FS em meios biológico(9).

Na TFD é utilizada luz visível ou infravermelho próximo. Essencialmente essa terapia envolve transições eletrônicas dos fármacos fotossensíveis os quais induzem reações fotoquímicas, que podem gerar uma cadeia de reações na ausência de luz, gerando produtos que induzem a ação terapêutica. A irradiação do tumor gera a excitação do fármaco fotossensibilizador a um estado eletrônico de maior energia, podendo este retornar ao estado fundamental através de processos radiativos, como a fluorescência ou fosforescência ou processos não-radiativos, como conversão interna, cruzamento inter sistema ou relaxações vibracionais (41). A ocorrência do cruzamento inter sistema, que na presença de oxigênio e do estado triplete excitado gerado, induz a produção de espécies reativas de oxigênio ( $^1O_2$ ,  $O_2^-$ ,  $OH^-$ ,  $H_2O_2$ , denominada EROs) que atacam núcleos específicos nas células gerando a morte de tais tecidos por apoptose ou necrose celular.

A Figura 5 apresenta os tipos dos mecanismos fotoquímicos do FS.

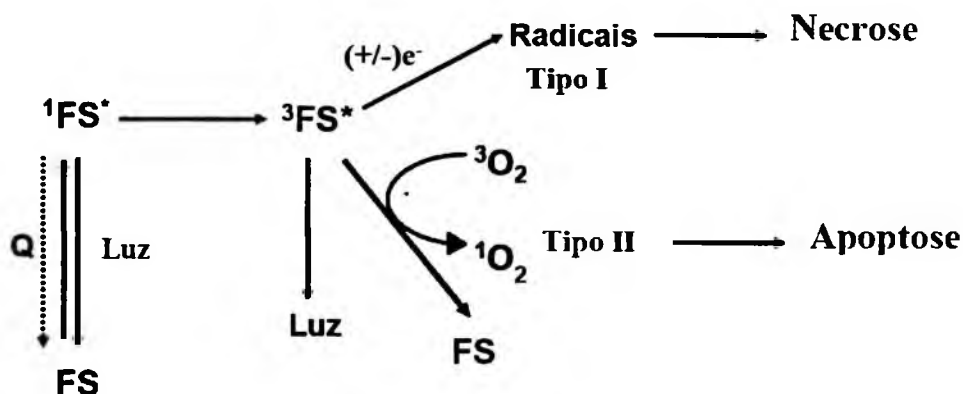


Figura 5: Mecanismos Fotoquímicos do fotossensibilizador, com a formação das espécies excitadas e tipos de morte envolvidos (14).

Na TFD, o processo fotooxidativo pode ocorrer através de dois mecanismos químicos principais: Tipo I e Tipo II (42) (Figura 5). Quando o FS absorve a luz, ele passa do seu estado fundamental (singlete; FS) para um estado singlete energeticamente excitado ( $1FS^*$ ). Por meio de colisão, fluorescência ou através de cruzamento entre sistemas este estado pode ser desativado, gerando um estado tripleto ( $3FS^*$ ). As moléculas de substratos biológicos podem reagir diretamente com o estado singlete excitado e o estado tripleto, transferindo hidrogênio ou elétrons, que produzem radicais e íons radicalares, que poderão interagir com o oxigênio para formar espécies reativas de oxigênio, como o superóxido e seus derivados. Este mecanismo é denominado mecanismo tipo I. No estado tripleto a transferência de energia pode ocorrer de forma direta para o oxigênio, formando o oxigênio singlete ( $^1O_2$ ), processo denominado de mecanismo tipo II. Devido a alta reatividade do oxigênio singlete é gerado uma série de reações que tem um grande número de substratos biológicos. Essas espécies são responsáveis por danos irreversíveis as células. Podendo ainda modificar proteínas, que desencadeiam uma série de mudanças no metabolismo celular e no mecanismo de sinalização que levam a morte celular.

Em 2006, Usuda e colaboradores (43) fizeram uma revisão sobre a TFD apresentando ensaios clínicos para câncer de pulmão e caracterizaram a TFD como uma boa terapia podendo ser utilizada conjuntamente com a remoção cirúrgica de tumores maiores e em tratamentos como a quimioterapia. Também apresentaram a

utilização da fibra ótica para auxiliar a condução da luz no comprimento de onda desejado em tumores localizados em diversas partes do corpo. A iluminação focalizada, em conjunto com a blindagem dos tecidos sensíveis na margem da área, habilita o tratamento específico do tumor sem a destruição dos tecidos saudáveis fora da área de tratamento. O maior benefício da TFD é que mesmo tendo grande destruição da área irradiada imediatamente após a terapêutica, posteriormente ocorre a reparação tecidual sem cicatrizes.

A TFD é uma terapia que requer uma aplicação sequenciada de droga, com intervalos de tempo para o tratamento, podendo ser de horas ou dias após a aplicação do fotossensibilizador. A iluminação precisa ser no comprimento de onda apropriado para cada fotossensibilizador. A destruição das células tumorais ocorre rapidamente e a vantagem da técnica é que os tecidos saudáveis se recuperam de seis a oito semanas. O surgimento de edemas e eritemas nos tecidos de animais são os primeiros indicativos clínicos da resposta da TFD (44).

Outra vantagem da TFD é a facilidade da aplicação da técnica, sendo possível ser realizada em um simples consultório, sem necessidade de internação. Sendo que tratamentos como a radioterapia são necessários irradiações diárias podendo levar de 6 a 7 semanas e a quimioterapia pode durar meses. Nas cirurgias é necessário anestesia geral e internação muitas vezes por longo período. Comparando tratamentos diversos de câncer com a TFD, esta demonstrou ser custo-eficaz e ainda aumentar a expectativa de vida de pacientes. Outro benefício da TFD é que a terapêutica pode ser repetida caso ocorra um novo tumor primário na área previamente aplicada (43).

A TFD pode ser subdividida em duas categorias principais: 1) Fototerapia Direta, quando há irradiação diretamente no local da lesão, sem o uso do fármaco fotossensível (FS). A luz aplicada é absorvida por moléculas endógenas existentes no organismo, que sofrem modificações, promovendo o efeito desejado; 2) Na forma indireta utiliza-se um FS que, administrado antes da emissão da luz, absorve a irradiação emitida; e este, após uma sequência de eventos, induz a ação fotodinâmica no organismo (45).

Levando em consideração o fenômeno EPR, os fármacos fotossensíveis acumulam-se preferencialmente nos tecidos neoplásicos devido à sua capacidade de capturar estes compostos, além de seu longo tempo de eliminação pelas células

tumorais quando comparadas com as células saudáveis. Os danos oxidativos que as células neoplásicas sofrem devido a fotoreação induzida pela TFD não são os únicos fatores responsáveis pela sua eficácia, que em determinados tumores pode chegar até 100% de cura (46), mas sim a complexidade de respostas biológicas envolvidas na TFD antineoplásica.

São três tipos diferentes, mas inter-relacionados, de mecanismos biológicos de efeitos antineoplásicos da TFD: (47) 1) a morte celular por necrose, apoptose ou autofagia, decorrentes diretamente dos danos oxidativos causados pela fotoreação. 2) obstrução da vasculatura tumoral, levando ao infarto do tecido tumoral; e 3) ativação do sistema imunológico contra as células neoplásicas. Após a realização da TFD a resposta imunológica aumenta, pois ocorre maior apresentação antigênica, o que contribui no efeito de proteção antitumoral sistêmica devido aos linfócitos de memória originados decorrente da morte celular tumoral(48).

Com tantos benefícios citados acima, a busca por novos agentes fotossensibilizadores que possam ser usados na TFD tem sido intensa nos últimos anos, assim nesse trabalho buscamos alternativas para tornar mais eficiente esta modalidade terapêutica.

### **1.3.1 Nanopartículas na TFD.**

Na 3ª geração de FS, a TFD é associada com a nanotecnologia. Existe uma infinidade de carregadores de FS, entre eles micelas, lipossomos, lipoproteínas de baixa densidade, micelas poliméricas e complexos poliméricos (49, 50) que podem ser utilizados.

Em grande parte da aplicação da TFD utiliza-se a liberação do FS do interior das NPs, esse procedimento pode causar efeitos colaterais, entre eles, acúmulo do FS na pele e nos olhos após o tratamento (51). Uma forma de superar este efeito indesejado é formar sistemas nos quais o FS não seja liberado do seu interior, mas sim da superfície da NP onde estaria apenas adsorvido. Como exemplo desses sistemas temos as nanopartículas metálicas, de ouro e magnéticas (52, 53). Wieder e colaboradores (53) investigaram a ligação do FS na superfície de nanopartículas de ouro e verificou que a eficiência de geração de  $^1O_2$  para FS na nanopartícula, foi

superior a eficiência do FS livre. Porém, a ligação de FS adsorvido em moléculas possui a desvantagem de possuir baixa incorporação da droga na nanopartícula.

### 1.3.2 Fotossensibilizador: Vermelho Neutro

No nosso trabalho utilizamos o corante vermelho neutro (VN) (Figura 6) cuja estrutura é baseada em uma fenazina. Esse corante tem sido utilizado como um indicador ácido-base devido ao seu forte pH dependente, a sua cor muda próximo a pH neutro região ( $pK_a = 6,8$ ) (54). A natureza relativamente não tóxica do VN torna-o um útil corante de coloração celular (55) sendo utilizado também como sonda lisossomal (56). A coloração característica e sua fluorescência muda com o pH do meio, assim a forma protonada ( $VNH^+$ ) e a forma neutra (VN) possui numerosas aplicações em biomoléculas (57-59). Neumann e colaboradores mostraram a fotoredução de outros derivados de fenazina, como a safranina, cuja estrutura é semelhante ao VN (60-62). Além disso, tem sido investigada a ação deste fotossensibilizador em diferentes solventes em busca de conhecer o comportamento fotofísico e fotoquímico do VN.

Em 1960, Goldhaber utilizou o vermelho neutro (63) no meio de reabsorção óssea de culturas para localizar o osteoclasto em culturas vivas, usando a microcinematografia, técnica onde o produto é uma imagem em movimento, a fim de seguir os osteoclastos, relatou contraste excelente com o vermelho neutro devido à afeição dos osteoclastos para este corante. No entanto, a iluminação utilizada no experimento teve um efeito fotodinâmico resultando na morte das células, impedindo o uso da técnica. Mais uma vez em 1963 foi observada a morte dos osteoclastos muito provavelmente devido ao efeito fotodinâmico da interação do corante vermelho neutro com a célula, na presença de oxigênio e a exposição frequente da luz do equipamento (63). Em 2007, Rimpapa e colaboradores (63) analisaram a inibição da fotólise do VN com diferentes antioxidantes, onde o este agia duplamente, como um gerador de radicais livres e, como um fotossensibilizador. O VN reagiu com biomoléculas como melanina e outras. Esta reação com a melanina é bem conhecida para fotossensibilizadores do tipo fenotiazínicos, como o azul de metileno e outros (64, 65).

Estes fotossensibilizadores possuem estruturas heteroaromáticas planares podendo ser utilizados na TFD como agentes antitumorais, e em terapia fotodinâmica antibacteriana como composto antimicrobiano (65)

A melhor faixa de absorção na utilização dos corantes na TFD, na janela terapêutica, é maior que 600 nm, a faixa de absorção do corante VN é de 540 nm (66), porém outras características favorecem o estudo do VN como FS, como a solubilidade em água, pois a grande maioria dos fármacos fotossensíveis são hidrofóbicos, possuindo baixa seletividade ao tumor. A baixa solubilidade em água gera a agregação, o que resulta na diminuição das propriedades fotodinâmicas (67). As características fundamentais que qualificam um FS na TFD é ser solúvel em fluidos biológicos, apresentar baixa toxicidade, ser efetivo na geração de espécies reativas de oxigênio e possuir um custo satisfatório nas aplicações clínicas e industriais (68).

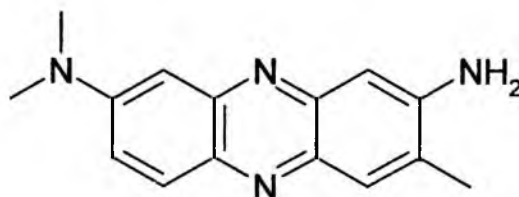


Figura 6: Fórmula estrutural do corante catiônico a ser avaliado: Vermelho Neutro (VN).

Embora a maioria das aplicações envolvendo TFD em diferentes centros de pesquisa se baseie na utilização do oxigênio singlete como espécie reativa, tem sido grande a procura por outras espécies úteis, como radicais livres derivados dos corantes utilizados, bem como outras espécies radicalares independentes de oxigênio. Além disso, a característica hipóxica de neoplasias de grande porte constitui-se a maior barreira quanto ao sucesso da TFD como terapia efetiva na fase clínica. Uma das possibilidades é utilizar corantes catiônicos como o vermelho neutro (VN) como fotossensibilizador.

## 6 CONCLUSÕES

Os resultados expostos neste trabalho permitiram concluir que:

1. Foram desenvolvidas de forma satisfatória as AuNPs pelo método de Turkevich com as alterações propostas.
2. O revestimento através do recobrimento com derivados de tióis nas AuNPs apresentou maior eficiência no carregamento do Fotossensibilizador.
3. Foi obtida uma formulação de nanopartículas de ouro revestidas pelo tiol (AuNPTGA FS) com diâmetros hidrodinâmico médios em torno de 110 nm e potencial zeta igual a -27 mV, com tamanho apropriado para o fenômeno de acúmulo passivo de nanopartículas em células tumorais, efeito EPR.
4. As AuNPTGA se mostraram menos tóxicas que as AuNPs e mais viáveis no estudo citotóxico realizado.
5. O citrato resultante da síntese das NPs não apresentou alteração na viabilidade celular, sendo desnecessária a centrifugação para a retirada do excesso do composto.

## 7 REFERÊNCIAS

- (1). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: INCA, 2011. p. 25.
- (2). J. K. Nanoparticles a historical perspective. *International journal of pharmaceutics*. 2007;331(1):1-10.
- (3). Zhang L Gf, Chan J, Wang A, Langer R, Farokhzad O. Nanoparticles in medicine: therapeutic application and developments. *Clinical pharmacology and therapeutics*. 2008;83(5):761-9.
- (4). L'azou B.;Jorly Jo, D.;Sellier,E.;Moisan,F.; Fleury-Feith, J.;Cambar,J.;Brochard,P.;Ohayon-Courtès,C. In vitro effects of nanoparticles on renal cells. *Particle and Fiber Toxicology*. 2008;5(22).
- (5). Roco MCJ. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Current Opinion in Biotechnology*.United States.Nanoparticle Res. 2001;3, 5.
- (6). Uskokovi V. *Tecnology in Society* 2007; 29:43.
- (7). Gai PLR, R.; White, M. G.; *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci*. 2002;6,:401.
- (8). Azevedo N., et al., O que é nanobiotecnologia? Atualidades e perspectivas. Instituto de Química, Laboratório de Química Biológica, UNICAMP, p. 1-10.
- (9). Paszko E ECSM, Kelleher DP, Reynolds JV. Nanodrug applications in photodynamictherapy. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2011;8(1):14-29.
- (10). Xiang T-X AB. Liposomal drug transport: A molecular perspective from molecular dynamics simulations in lipid bilayers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. [doi:10.1016/j.addr.2006.09.002].2006;58(12-13):1357-78.
- (11). Brannon-Peppas L BJ. Nanoparticle and targeted systems for cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2004;56(11):1649-59.
- (12). Maeda H MY. Tumortropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Critical reviews in therapeutic drug carrier systems*. 1989;6(3):193.
- (13). Faraji Ah, Wipf, P. Nanoparticles in cellular drug delivery. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 2009;17:2950–62.



- (14). Tada D.B. Desenvolvimento de Nanopartículas Fotossensibilizadoras. Tese apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências (Bioquímica) 1º Novembro de 2007.
- (15). Bradley G, Juranka, P.J.; Ling, V. *Biochim Biophys Acta*. 1988;948:87-112.
- (16). Roninson Ib. *Clin Physiol Biochem*. 1987;5: 140- 51.
- (17). Cuvier Cr-T, L.; Millt, J.M.; Lizard, Ge e et al. *Biochem Pharmacol*, 4;. 1992;44(3)::509-17.
- (18). Nemati Fdcf, H.; Colin De Verdier, A.; Poupon, M.F.;; Puisieux Fc, P. *International journal of pharmaceutics*. 1996;138,:237,46.
- (19). Reska Rb, P.; Fichtner,I.; Hentschel, M.; Ritcher, J., Kreuter, J.:. *J Pharmacol ExperTherap*. 1996;280(1):232-7.
- (20). Fukumori Yi, H. *Advanced Powder Technology*. 2006;17 (1):1-28.
- (21). Xiang T-X AB. Liposomal drug transport: A molecular perspective from molecular dynamixs simulations in lipid bilayers. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2006;58(12-13):1357-78.
- (22). Huff Tb, Tong, L., Zhao, Y., Hansen, M. N., Cheng, J. X., Wei, A. v., p., 2007. Hyperthermic effects of gold nanorods on tumor cells. *Nanomedicine-UK*. 2007;2(1): 125-32.
- (23). Azzazy Hmemmhm. In vitro diagnostic prospects of nanoparticles. *Clinica Chimica Acta*. 2009;403.1-2 1-8.
- (24). De M, P. S. Ghosh. ; V. M. Rotello. . *Applications of Nanoparticles in Biology*. *Advanced Materials*. 2008;20.22:4225-41.
- (25). Hayashi A, et al. . Subretinal delivery of immunoglobulin G with gold nanoparticles in the rabbit eye. *Japanese Journal of Ophthalmology*. 2009; 53.3 249-56.
- (26). Lim Yt, et al. . Simultaneous intracellular delivery of targeting antibodies and functional nanoparticles with engineered protein G system. *Biomaterials* 2009;30.6:1197-204.
- (27). Patra C., et al. . Fabrication of Gold Nanoparticle for Potential Application in Multiple Myeloma. *Journal of Biomedical Nanotechnology*. 2008;4.4:499-507.

- (28). Jaemoon Yang KE, Eun-Kyung Lim, Jinsung Park,§ Yoonah Kang,, Dae Sung Yoon SN, Eui Kwan Koh,3 Jin-Suck Suh, Yong-Min Huh,, Tae Yun Kwon aSH. In Situ Detection of Live Cancer Cells by Using Bioprobes Based on Au Nanoparticles. *Langmuir*. 2008;24:12112-5.
- (29). Brus L. *Acc Chem Res*. 2008;41:1742.
- (30). Jain Pk, El-Sayed, I., H., El-Sayed, M. A. . Au nanoparticles target cancer. *Nano Today*. 2007;2(1):18-29.
- (31). Huang X, El-Sayed I.H., Qian, W., El-Sayed, M. A. . Cancer Cell Imaging and Photothermal Therapy in the Near-Infrared Region by Using Gold Nanorods. *J AmChem Soc* 2006;128:2115-20.
- (32) Ancient Text Daniel MCA, D. Gold nanoparticles: assembly, supramolecular chemistry, quantum-size-related properties, and applications toward biology, catalysis, and nanotechnology. 2004:293 - 346.
- (33). Toma H. E. ZVM, Toma S. H. ; Araki K. The Coordination Chemistry at Gold Nanoparticles. *J Braz Chem Soc*. 2010;21(7):1158-76.
- (34). Ghosh P, Han, G., De, M., Kim, C. K., Rotello V. M. v., 2008. Gold nanoparticles in delivery applications. . *Adv Drug Deliver Rev*.60:1307–15.
- (35). Li X, Zhang J, Xu W, Jia H, Wang X, Yang B, et al. Mercaptoacetic Acid-Capped Silver Nanoparticles Colloid:â€‰ Formation, Morphology, and SERS Activity. *Langmuir*. 2003 2012/11/13;19(10):4285-90.
- (36). Henderson B, T.J. *Photochem Photchem*. 1992;55:145-57.
- (37). Kessel D. *Science & Medicine*. 1998:46-55.
- (38). Simplício Fim, F.; Hioka, N., . *Química Nova*. 2002;25 (5):801-7.
- (39). Maccormack M. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. . *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, Philadelphia, . 2008;7:52-62.
- (40). Dougherty Tjg, C.J.; Henderson, B.W.; Jori, G.; Kessel, , D.; Korbelik M. Photodynamic therapy. . *Journal of the National Cancer Institute*, Bethesda. 1998;90:889-905.
- (41). Juzeniene An, K. P.; Moan, J. . Biophysical Aspects of Photodynamic Therapy. *Journal of Environmental Pathology, Toxicology, and Oncology* 006;257-28.

- (42). Simplicio Fim, F.; Hioka, N. . Terapia fotodinâmica: aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. *Química Nova*. 2002;25:801-7.
- (43). Usuda J. Kh, Okunaka T. et. al. . Photodynamic Therapy (PDT)for Lung Cancers. *Journal of Thoracic Oncology*. 2006;1(5): 489-93.
- (44). Brown S. B Beawwi. The Present and Future Role of Photodynamic Therapy in Cancer Treatment *Lancet Oncol*. 2004;5:497-508.
- (45). Dalla Via L. Maciani Magno S. . Photochemotherapy in the treatment of cancer. *Current Medicinal Chemistry*. Oct.2001;8:1405-18.
- (46). Kübler A DCJ, Hopper C, Leonard A, Putnam G. International journal of oral and maxillofacial surgery. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. . *International journal of oral and maxillofacial surgery* 2001;30(6):504-9.
- (47). Ficzuk M ND, Golab J. PDT -induced inflammatory and host responses. . *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2011;10(5):653-63.
- (48). Castano Apm, P.; Hamblin, M.R. Photodynamic therapy and antitumour immunity. *Nature Reviews-Cancer*, London. 2006;v.6:535-45.
- (49). Konan Yng, R.; Allemann, E. *J Photochem Photobiol, B*. 2002.;66:89-106.
- (50). Urizzi Pa, C. M. ; Langlois, R. ; Ouellet, R. ; La Madeleine, C. ; Van Lier, J.E. *J Porphyrins Phthalocyanines*. 2001;5:154-60.
- (51). Dillon Jk, J. C.; Pottier, R. H.; Roberts, J. E. *Photochem. Photobiol*. 1988;48:235-8.
- (52). Tada DBea. Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: a potential magnetic carrier for photodynamic therapy. *Langmuir* 2007;23:8194-9.
- (53). Wieder MEea. Intracellular photodynamic therapy with photosensitizer-nanoparticle conjugates: cancer therapy using aTrojan horse. *Photochem Photobiol Sci*. 2006;5:727-34.
- (54). Kostov Y, et al. . Membranes for Optical pH Sensors. *Analytica Chimica Acta*. 1993;280.1:15-9.
- (55). Cardona Pj, et al. Neutral-red reaction is related to virulence and cell wall methyl-branched lipids in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*. 2006);8.1:183-90.

- (56). Repetto GPS. Neutral Red Uptake, Cellular Growth and Lysosomal Function - In-Vitro Effects of 24 Metals. *Atla-Alternatives to Laboratory Animals* 1993;21.4:501-07.
- (57). Al-Hassan Lafa-A. Photolytic and photosensitised reduction of neutral red under VIS radiation. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry* 1998;119.3:205-12.
- (58). CAO Y. e at al., Studies of interaction of phenazine dye and DNA by UV-Vis spectrum. *Chemical Journal of Chinese Universities-Chinese* 1998;19.5: 714-16.
- (59). Lhasan Lasma. Photoreactions and Photoinduced Reactions of Some Cationic Dyes with Cyclohexanone. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*. 1993;72.3:217-24.
- (60). Encinas Mv, et al. . The interaction of aliphatic amines with safranin T in aqueous solution. *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*. 1996;94.2-3:237-41.
- (61). Neumann M, C. C. Schmitt; B. E. Goi. . The mechanism of the photoinitiation of methyl methacrylate polymerization by the neutral red/triethylamine system. . *Journal of Photochemistry and Photobiology A-Chemistry*. 2005;174.3:239-45.
- (62). Rodrigues M. e at al., Cationic photopolymerization of tetrahydrofuran: A mechanistic study on the use of a sulfonium salt-phenothiazine initiation system. *Journal of Polymer Science Part A-Polymer Chemistry*. 2001;39.1: 46-55.
- (63). Rimpapa Z SE, Sapcanin A, Toromanović J, Tahirović I. . Inhibition of Neutral red photolysis with different antioxidants. . *Bosn J Basic Med Sci*. 2007;7(1):55-7.
- (64). Hamblin Mr, et al. . Polycationic photosensitizer conjugates: effects of chain length and Gram classification on the photodynamic inactivation of bacteria. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 2002;49.6: 941-51.
- (65). Jori G. Photodynamic therapy of microbial infections: State of the art and perspectives. . *Journal of Environmental Pathology Toxicology and Oncology*. 2006;25.1-2:505-19.
- (66). Wainwright M. Photoinactivation of viruses. *Photochem Photobiol Sci*. 2004;3:406-11.

- (67). Saxena Vs, M.; Shao, J. . Enhanced photo-stability, thermal-stability and aqueous-stability of indocyanine green in polymeric nanoparticulate systems. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology* 74:29-38.
- (68). Konopka KaTG, . . : p.. Photodynamic therapy in dentistry. *Journal of dental research*,. 2007;86(8).
- (69). YEN Gslas, E. H. . Photosensitization of Herpes Simplex Virus Type 1 with Neutral Red. *J gen Virol*. 1978;4x:273-281.
- (70). Tom RT, Pradeep T. Interaction of Azide Ion with Hemin and Cytochrome c Immobilized on Au and Ag Nanoparticles. *Langmuir*. 2005 2012/11/09;21(25):11896-902.
- (71). Simion A.R.i MOP, Lacava Z.G.M., et al. *J Nanosci Nanotechnol*. 2006;6:2413.
- (72). Min Zhou<sup>1</sup> BW, Zbigniew Rozynek, Zhaohui Xie, Jon Otto Fossum, Xiaofeng Yu and Steinar Raaen. Minute synthesis of extremely stable gold nanoparticles. *Nanotechnology IOP PUBLISHING*. 2009; 20 505606 (10pp) doi:10.1088/0957-4484/20/50/.
- (73). T. FVC. Polímeros Condutores e Monocamadas Auto-montadas na Concepção de Novas Arquitecturas contendo nanopartículas Metálicas: Preparação, Caracterização e Desempenho para Electrocatálise e Biosensores. Doutorado em Química.(Química-Física)- Universidade de Lisboa Faculdade de Ciências. 2011.
- (74). Jinlong Cea. *Anal Chim Acta*. 2007;599:134.
- (75). Murugadoss A. ea. *J Nanopart Res*. 2010;12:1331.
- (76). Cheng Y CSA, Meyers JD, Panagopoulos I, Fei B, Burda C. Highly efficient drug delivery with gold nanoparticle vectors for in vivo photodynamic therapy of cancer. *J Am Chem Soc* 2008 130(32)::10643-7.
- (77). Cheng Y MJ, Broome AM, Kenney ME, Basilion JP, Burda C. Deep penetration of a PDT drug into tumors by noncovalent drug-gold nanoparticle conjugates. *J Am Chem Soc*. 2011;133(8):2583-91.
- (78). Cheng Y, Meyers JD, Broome A-M, Kenney ME, Basilion JP, Burda C. Deep Penetration of a PDT Drug into Tumors by Noncovalent Drug-Gold Nanoparticle Conjugates. *Journal of the American Chemical Society*. 2012/11/05;133(8):2583-91.

- (79). L. O. Técnica de Caracterização de Nanopartículas metálicas funcionalizadas. Dissertação Instituto de Química - UNICAMP.
- (80) Toma HEB, Leonardo da Silva Anaissi, Fauze J. Da cor a cor inexistente: uma reflexão sobre espectros eletrônicos e efeitos cromáticos. *scielo* 2005:897-900.
- (81). G. M. *Ann Phys.* 1908;25:377.
- (82). Wannemacher R. HM, Pack A. *Optics Communications.* 2001, 194: 277-87.
- (83). L.S. B. Processos de Agregação e fusão de nanopartículas de ouro: Uma abordagem química. São Paulo. Mestrado [Dissertação Instituto de Química]- Universidade de São Paulo. 2006.
- (84). Klabunde KJ. *Nanoscale materials in chemistry.* Wiley Interscience, Estados Unidos. 2001.
- (85). Hostler M.J. e at al. Alkanethiolate gold cluster molecules with core diameters from 1,5 to 5,2 nm: core and monolayer properties as a function of core size. *Langmuir.* 1998;14:17-30.
- (86). Joseph. Y. e at al. Self-assembles gold nanoparticle/alkanedithiol films: preparation, electron microscopy, XPS-analysis, charge transport and vapor-sensing properties. *J Phys Chem B* 2003;107:7406-13.
- (87). Pernodet NF, Xiaohua Sun, Yuan Bakhtina, Asya Ramakrishnan, Aditi Sokolov, Jonathan Ulman, Abraham Rafailovich, Miriam. Adverse Effects of Citrate/Gold Nanoparticles on Human Dermal Fibroblasts. *Small.* 2006;2(6):766-73.
- (88) Uboldi C, Bonacchi D, Lorenzi G, Hermanns MI, Pohl C, Baldi G, et al. Gold nanoparticles induce cytotoxicity in the alveolar type-II cell lines A549 and NCIH441. 2009:18.
- (89). Disponível em :Instrutécnica.  
<http://www.instrutec.com.br/v2/represent/bic/teoriazeta.html>. retirado do site dia 12 de abril de 2012.
- (90). Disponível em :<http://nanocomposix.com/kb/general/characterization-techniques#dls>).Retirado dia 17 de outubro de 2012.
- (91). Casero E., F. Pariente, E. Lorenzo, J. Martin-Benito, L. Vázquez, *Nano Lett.* 2002;2 577.

- (92). S.-Y. Lin Y-TT, C.-C. Chen, C.-M. Lin, C.-H. Chen. *J Phys Chem.* 2004;B 108:2134.
- (93). Sandström P. MB, B. Åkerman, *Langmuir* 19 (2003) 7537. *Langmuir* (2003) 19:7537.
- (94). S.-J. Chen H-TC, . (2004) 3727. *Anal Chem.* 2004;76 3727.
- (95). Lee Kh Fau - Chen S-J, Chen Sj Fau - Jeng J-Y, Jeng Jy Fau - Cheng Y-C, Cheng Yc Fau - Shiea J-T, Shiea Jt Fau - Chang H-T, Chang HT. Fluorescence and interactions with thiol compounds of Nile Red-adsorbed gold nanoparticles. *SO - J Colloid Interface Sci* 2007 Mar 15;307(2):340-8 Epub 2006 Dec 9.
- (96). Miranda O. M., S.;Rotello,V.M. Size and geometry dependent protein-nanoparticle self-assembly. *Chemical Communications.* 009;16:2157-9.
- (97). Gu Yc, J.P.;Lin,C.C.;Lam,Y.W.;Cheng,S.H.;Wong,W.T. . Nuclear penetration of surface functionalized gold nanoparticles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 2009;237 (2): 196-204.
- (98). Yen Hjh, S. H.; Tsai, C. L. . Cytotoxicity and immunological response of gold and silver nanoparticles of different sizes. *Small.* 2009;5 (13):1553-61.
- (99). Soenen Sjr-G, P.; Montenegro, J. M.; Parak, W. J.; De Smedt, S. C.; Braeckmans, K. . Cellular toxicity of inorganic nanoparticles: Common aspects and guidelines for improved nanotoxicity evaluation. *Nano Today.* 2011; 6 (5):446-65.
- (100). Qu Y LX. Aqueous synthesis of gold nanoparticles and their cytotoxicity in human dermal fibroblasts-fetal. *Biomed Mater.* 2009 Apr;4(2) 025007:1-6.
- (101). O MK YX, Du H, Wang H. 5-aminolevulinic acid-conjugated gold nanoparticles for photodynamic therapy of cancer.. *Nanomedicine.* 2008;Dec,3(6):777-86.
- (102). Xu H LC, Mei J, Yao C, Wang S, Wang J, Li Z, Zhang Z. ;. Effects of light irradiation upon photodynamic therapy based on 5-aminolevulinic acid-gold nanoparticle conjugates in K562 cells via singlet oxygen generation. *Int J Nanomedicine* 2012;7:5029-38.
- (103). Byambajav Lkhagvadulam KJH, Yoon Il , ShimY. K. Size-dependent photodynamic activity of gold nanoparticles conjugate of water soluble purpurin-18-N-methyl-D-glucamine PDT Research Institute, School of Nano SystemEngineering, Inje University, Gimhae 621-749, South Korea.