



DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS  
MULTIFUNCIONAIS, COM PROPRIEDADES FLUORESCENTES E  
MAGNÉTICAS, PARA APLICAÇÕES TERANÓSTICAS TUMORAIS

Marcel Guimarães Martins

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Engenharia Química, COPPE, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Engenharia Química.

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Priscilla Vanessa Finotelli

Rio de Janeiro  
Outubro de 2023

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS  
MULTIFUNCIONAIS, COM PROPRIEDADES FLUORESCENTES E  
MAGNÉTICAS, PARA APLICAÇÕES TERANÓSTICAS TUMORAIS

Marcel Guimarães Martins

TESE DE DOUTORADO SUBMETIDA AO CORPO DOCENTE DO INSTITUTO  
ALBERTO LUIZ COIMBRA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA DE  
ENGENHARIA (COPPE) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS PARA A OBTENÇÃO DO  
GRAU DE DOUTOR EM CIÊNCIAS EM ENGENHARIA QUÍMICA.

Examinada por:

---

Prof<sup>a</sup>. Helen Conceição Ferraz, D.Sc.

---

Prof. José Carlos Costa da Silva Pinto, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Priscilla Vanessa Finotelli, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Ângela Maria Moraes, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Cláudia Sayer, D.Sc.

---

Prof<sup>a</sup>. Nanci Câmara de Lucas Garden, D.Sc.

---

Neuman Solange de Resende, D.Sc.

RIO DE JANEIRO, RJ - BRASIL

OUTUBRO DE 2023

## CIP - Catalogação na Publicação

M386d            Martins, Marcel Guimarães  
                    Desenvolvimento de sistemas nanoestruturados  
                    multifuncionais, com propriedades fluorescentes e  
                    magnéticas, para aplicações teranósticas tumorais /  
                    Marcel Guimarães Martins. -- Rio de Janeiro, 2023.  
                    241 f.

                    Orientadora: Helen Conceição Ferraz.  
                    Coorientador: José Carlos Costa da Silva Pinto.  
                    Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio  
                    de Janeiro, Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós  
                    Graduação e Pesquisa de Engenharia, Programa de Pós  
                    Graduação em Engenharia Química, 2023.

                    1. Nanopartículas magnéticas. 2. Nanossistemas  
                    fluorescentes. 3. Hipertermia magnética. 4.  
                    Microtomografia. 5. Teranóstica tumoral. I. Ferraz,  
                    Helen Conceição , orient. II. Pinto, José Carlos  
                    Costa da Silva , coorient. III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob a responsabilidade de Miguel Romeu Amorim Neto - CRB-7/6283.

A meu primo Tales (*in memoriam*) – alma mais evoluída que já conheci até hoje –  
por motivar e ajudar a concretização deste trabalho, que apenas se inicia aqui.

# AGRADECIMENTOS

A meus pais e irmãos, meu incondicional agradecimento. Obrigado pelo apoio irrestrito e esforços concedidos em todos os momentos.

A meus familiares e amigos, por apoiar as minhas escolhas e pelo carinho, paciência e incentivo, mesmo quando não compreendiam a proposta deste trabalho como um todo.

Aos orientadores, pela confiança, atenção e dedicação. Obrigado por apoiarem e darem suporte não apenas no âmbito acadêmico, mas também no aspecto pessoal/psicológico. Por entenderem que uma tese é muito mais do que produção a qualquer custo e que pode, e deve, ir além das fronteiras acadêmicas, gerando satisfação pessoal e impacto social. Vocês são grandes exemplos de seres humanos, que dão sentido à pesquisa científica de qualidade e propósito.

A todos os mentores acadêmicos que passaram por minha trajetória. Obrigado por cada pílula de conhecimento.

Às amigas da UFF, que se iniciaram na graduação e serão mantidas e cultivadas para sempre, bem como às amigas da UFRJ, conquistadas ao longo da pós-graduação.

A minhas sócias da Magtech, por acreditarem que é possível construir uma empresa em paralelo a um mestrado e doutorado. Obrigado por apoiarem e incentivarem este ideal.

Aos alunos de iniciação científica e estagiários, aos quais tive a oportunidade de orientar durante o doutorado. Obrigado por me permitirem aprender cada vez mais ao passar para vocês um pouco do que sei.

Aos laboratórios que contribuíram com a realização de medidas e caracterizações apresentados neste trabalho. Em particular, agradeço às instituições e centros de pesquisa envolvidos, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Universidade Federal Fluminense (UFF) e Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

À FAPERJ e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

Resumo da Tese de Doutorado apresentada à COPPE/UFRJ como parte dos requisitos necessários para a obtenção do grau de Doutor em Ciências (D.Sc.)

DESENVOLVIMENTO DE SISTEMAS NANOESTRUTURADOS  
MULTIFUNCIONAIS, COM PROPRIEDADES FLUORESCENTES E  
MAGNÉTICAS, PARA APLICAÇÕES TERANÓSTICAS TUMORAIS

Marcel Guimarães Martins

Outubro/2023

Orientadores: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Priscilla Vanessa Finotelli

Programa: Engenharia Química

A nanomedicina teranóstica é capaz de integrar diagnóstico e tratamento em uma única plataforma, empregando nanomateriais, como nanopartículas magnéticas. Além disso, a utilização de nanomateriais com propriedades fluorescentes apresentam a vantagem de visualização de alvos biológicos e monitoramento em tempo real. Visando aplicação em nanomedicina teranóstica voltada ao câncer, neste trabalho foram sintetizadas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro pelo método de coprecipitação, resultando em materiais com diâmetro médio de 12 nm e magnetização de saturação de 76 emu.g<sup>-1</sup> (300 K). As nanopartículas magnéticas foram encapsuladas em nanopartículas poliméricas (~200 nm), em combinação com um fluoróforo natural (extrato de cúrcuma), via polimerização por miniemulsão. A presença tanto do fluoróforo quanto do material magnético influenciou a cinética de polimerização, bem como as propriedades do polímero final. Medidas de fluorescência dos polímeros obtidos na presença do fluoróforo confirmaram a fluorescência do material e indicaram que a matriz polimérica promove incremento da fotoestabilidade da molécula. Por fim, foram realizados ensaios de internalização em células de mamíferos (modelos 2D e 3D) e os resultados validaram as propriedades dos nanossistemas propostos quanto ao potencial de contraste de imagem por microtomografia (diagnóstico por imageamento magnético) e à capacidade de liberação de calor, quando submetidos a um campo magnético alternado (tratamento por hipertermia magnética).

Abstract of Thesis presented to COPPE/UFRJ as a partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Science (D.Sc.)

DEVELOPMENT OF MULTIFUNCTIONAL NANOSTRUCTURED SYSTEMS,  
WITH FLUORESCENT AND MAGNETIC PROPERTIES,  
FOR TUMOR THERANOSTIC APPLICATIONS

Marcel Guimarães Martins

October/2023

Advisors: Helen Conceição Ferraz

José Carlos Costa da Silva Pinto

Priscilla Vanessa Finotelli

Department: Chemical Engineering

Theranostic nanomedicine can integrate diagnosis and treatment on a single platform, employing nanomaterials such as magnetic nanoparticles. Additionally, the use of nanomaterials with fluorescent properties has the advantage of visualizing biological targets and real-time monitoring. With a focus on theranostic nanomedicine for cancer, this study synthesized superparamagnetic iron oxide nanoparticles using the coprecipitation method, resulting in materials with an average diameter of 12 nm and a saturation magnetization of  $76 \text{ emu.g}^{-1}$  (at 300 K). The magnetic nanoparticles were encapsulated within polymeric nanoparticles (~200 nm) with a natural fluorophore (turmeric extract) through miniemulsion polymerization. The presence of both the fluorophore and the magnetic material influenced the polymerization kinetics, as well as the properties of the final polymer. Fluorescence measurements of the obtained polymers in the presence of the fluorophore confirmed the material's fluorescence and indicated that the polymeric matrix enhances the photo-stability of the molecule. Finally, internalization assays were conducted on mammalian cells (2D and 3D models), and the results validated the properties of the proposed nanosystems in terms of their potential for imaging contrast by microtomography (magnetic imaging diagnosis) and their ability to release heat when subjected to an alternating magnetic field (magnetic hyperthermia treatment).

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- AA:** Ácido acrílico
- A<sub>max</sub>:** Valor máximo de absorvância
- AMF:** *Alternating magnetic field* (Campo magnético alternado)
- APTMS:** (3-Aminopropil)trimetoxisilano
- BSA:** *Bovine serum albumin* (Albumina de soro bovino)
- CTR:** Controle
- CPMG:** *Carr-Purcell-Meiboom-Gill*
- DAPI:** *4',6-diamidino-2-phenylindole* (4',6-diamidino-2-fenilindol)
- DLS:** *Dynamic light scattering* (Dispersão dinâmica de luz)
- DMEM:** *Dulbecco's modified Eagle medium* (Meio Eagle modificado de Dulbecco)
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DRX:** Difração de Raios X
- EDC:** Carbodiimida
- EDS:** *Energy dispersive X-ray spectroscopy* (Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva)
- EMA:** *European Medicines Agency* (Agência Europeia de Medicina)
- EROs:** Espécies reativas de oxigênio
- EtOH:** Etanol
- FDA:** *Food and Drug Administration* (Administração de Alimentos e Medicamentos)
- F<sub>max</sub>:** Valor máximo de fluorescência
- F<sub>obj</sub>:** Função objetivo
- FTIR:** *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier)
- GPC:** *Gel permeation chromatography* (Cromatografia de permeação em gel)
- H:** Campo magnético
- H<sub>c</sub>:** Campo coercivo
- HD:** Hexadecano
- ICSD:** *Inorganic Crystal Structure Database* (Banco de Dados de Estrutura Cristalina Inorgânica)
- ILP:** *Intrinsic loss power* (Perda de potência intrínseca)
- INCA:** Instituto Nacional de Câncer

**ISO:** *International Organization for Standardization* (Organização Internacional para Padronização)

**IVIS:** *In vivo imaging system* (Sistema de imagem *in vivo*)

**LED:** *Light emitting diode* (Diodo emissor de luz)

**M:** Magnetização

**MET:** Microscopia eletrônica de transmissão

**MEV:** Microscopia eletrônica de varredura

**MicroCT:** Microtomografia computadorizada

**MMA:** Metacrilato de metila

**M<sub>n</sub>:** Massa molar média numérica

**M<sub>r</sub>:** Magnetização remanente

**MRI:** *Magnetic resonance imaging* (Imagem por ressonância magnética)

**M<sub>s</sub>:** Magnetização de saturação

**MTT:** *3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide* (Brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)

**M<sub>w</sub>:** Massa molar média ponderal

**NaOH:** Hidróxido de sódio

**NE:** Número de experimentos

**NPs:** Nanopartículas

**NPM:** Nanopartícula magnética

**NPP:** Nanopartícula polimérica

**OMS:** Organização Mundial da Saúde

**P(MMA-co-AA):** Poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico)

**PMMA:** Poli(metacrilato de metila)

**PBO:** Peróxido de benzoíla

**PBS:** *Phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)

**PCR:** *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

**PDDA:** Poli(dialildimetilamônio)

**PDI:** *Polydispersity index* (Índice de polidispersidade)

**PEG:** Polietilenoglicol

**PFA:** Paraformaldeído

**pI:** Ponto isoelétrico

**PLA:** Poli(ácido láctico)

**PLGA:** Poli(ácido láctico-co-ácido glicólico)

**PTFE:** Politetrafluoretileno

**PVA:** Poli(acetato de vinila)

**PVP:** Polivinilpirrolidona

**RF:** Radiofrequência

**RMN:** Ressonância magnética nuclear

**Rod-B:** Rodamina B

**S<sub>0</sub>:** Estado fundamental singlete

**S<sub>1</sub>:** Estado excitado singlete

**SAOS2:** Células de osteossarcoma

**SAR:** *Specific absorption rate* (Taxa de absorção específica)

**SD:** *Standard deviation* (Desvio padrão)

**SDS:** *Sodium dodecyl sulfate* (Dodecil sulfato de sódio)

**SFB:** Soro fetal bovino

**SLP:** *Specific loss power* (Perda específica de potência)

**SPION:** *Superparamagnetic iron oxide nanoparticles* (Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro)

**T1:** Relaxação longitudinal

**T2:** Relaxação transversal

**TC:** Tomografia computadorizada

**TFD:** Terapia fotodinâmica

**TGA:** *Thermogravimetric analysis* (Análise termogravimétrica)

**THF:** Tetrahidrofurano

**UCNPs:** *Upconverting nanoparticles* (Nanopartículas de conversão ascendente)

**UV:** Ultravioleta

**UV-vis:** Ultravioleta visível

**VSM:** *Vibrating-sample magnetometry* (Magnetometria de amostra vibrante)

**y<sup>e</sup>:** Valor experimental medido

**y<sup>C</sup>:** Valores calculados

**φ<sub>H</sub>:** Diâmetro hidrodinâmico

**ζ:** Potencial zeta

**λ<sub>abs</sub>:** Comprimento de onda de absorção

**λ<sub>em</sub>:** Comprimento de onda de emissão

**λ<sub>ex</sub>:** Comprimento de onda de excitação

**λ<sub>máx</sub>:** Comprimento de onda de máxima absorção

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Microscopia de fluorescência de tecido pulmonar contendo células tumorais.	3
<b>Figura 2.</b> Linha do tempo de avanço no desenvolvimento da nanomedicina.....	4
<b>Figura 3.</b> Estratégias de entrega sítio-dirigida, estratégias de design e desafios da próxima geração para diferentes plataformas em nanomedicina oncológica. ....	5
<b>Figura 4.</b> Reações de transferência de prótons na curcumina. ....	18
<b>Figura 5.</b> Equilíbrio tautomérico da curcumina.....	19
<b>Figura 6.</b> Diagrama Jablonski para uma molécula orgânica.....	20
<b>Figura 7.</b> Espectro de absorção (linha contínua) e espectro de fluorescência (linha tracejada) do antraceno em benzeno.....	21
<b>Figura 8.</b> Pulso de radiofrequência emitido sob um próton alinhado a um campo magnético externo que sofre efeito de magnetização longitudinal (T1) e magnetização transversal (T2).....	25
<b>Figura 9.</b> Curvas de relaxação longitudinal (A) e transversal (B), obtidas após remoção do pulso de radiofrequência.....	25
<b>Figura 10.</b> Imagem de Ressonância Magnética Nuclear gerada por medição do parâmetro T1 (A) e do parâmetro T2 (B). ....	27
<b>Figura 11.</b> Representação ilustrativa de um sistema TC e seus componentes (A e B) e imagem abdominal obtida a partir de um escaneamento TC (C). ....	29
<b>Figura 12.</b> Representação ilustrativa de um sistema microCT e seus componentes (A e B) e imagens de cortes transversais através do corpo de um camundongo a partir de um escaneamento microCT (C). ....	31
<b>Figura 13.</b> Representação esquemática do tratamento de câncer por hipertermia magnética, empregando nanopartículas magnéticas: (a) introdução do fluido magnético no tecido tumoral e (b) aplicação de campo magnético alternado para induzir o aquecimento.....	32
<b>Figura 14.</b> Espectro de absorção, ao longo do tempo, da curcumina (presente no extrato de cúrcuma) extraída em diferentes meios (NaOH (0,1 mol L <sup>-1</sup> ), HCl (0,1 mol L <sup>-1</sup> ), etanol (99%)). ....	56
<b>Figura 15.</b> Espectro de absorção ao longo do tempo da cúrcuma extraída em monômeros (100% MMA, 100% ácido acrílico AA e 90% MMA:10% AA. ....	59
<b>Figura 16.</b> Comparação dos espectros de emissão ( $\lambda_{ex} = 420$ nm) do extrato de cúrcuma obtido em etanol e nos monômeros (MMA, AA e 9MMA:1AA). ....	60

<b>Figura 17.</b> Trajetórias dinâmicas dos rendimentos de polimerização e massas molares médias (aos 30 min de reação) dos polímeros (PMMA e PMMA_C). .....	61
<b>Figura 18.</b> Espectro de absorção no estado sólido do PMMA_C e imagem do polímero emitindo luz após irradiação por lâmpada UV ( $\lambda = 365$ nm). .....	62
<b>Figura 19.</b> Espectro de emissão no estado sólido ( $\lambda_{ex} = 410$ nm) do PMMA_C após irradiação a 25 °C usando (A) lâmpada UVA (315–380 nm) e (B) LED branco. ....	63
<b>Figura 20.</b> Espectro de absorção e emissão no estado sólido dos filmes finos de PMMA_C e P(MMA-co-AA)_C. O espectro de emissão foi obtido sob excitação no comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{ex} = 410$ nm). ....	64
<b>Figura 21.</b> Imagens das amostras PMMA_C (esquerda) e P(MMA-co-AA)_C (direita) obtidas em microscópio de fluorescência invertido. ....	65
<b>Figura 22.</b> Resultados obtidos com o modelo proposto. A- Comparação entre os dados de conversão previstos e os dados experimentais do branco. B/C- perfis temporais de massas molares médias. ....	66
<b>Figura 23.</b> Comparação entre os dados experimentais na presença do extrato de cúrcuma e os valores previstos pelo modelo proposto. A- Conversão e B/C- perfis temporais de massas molares médias. ....	67
<b>Figura 24.</b> Superfície de resposta para conversão da polimerização ( $C_{10}$ ). ....	72
<b>Figura 25.</b> Superfície de resposta para fluorescência ( $A_{max}$ ). ....	72
<b>Figura 26.</b> Otimização das condições de reação por meio da superposição de superfícies de resposta para rendimento e fluorescência. ....	73
<b>Figura 27.</b> Linha do tempo com alguns exemplos de nanopartículas aprovadas para uso clínico pelo FDA e/ou EMA para diferentes tipos de tratamentos. ....	78
<b>Figura 28.</b> Difractogramas obtidos para amostras de nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas (NPM) e funcionalizadas com APTMS (NPM-NH <sub>2</sub> ), com indexação dos picos em relação a ficha cristalográfica da magnetita (JCPDS N° 89-4319). ....	88
<b>Figura 29.</b> Análise morfológica de nanopartículas de magnetita e respectivo histograma de distribuição de A) nanopartículas puras e B) nanopartículas funcionalizadas. ....	90
<b>Figura 30.</b> Espectros de FTIR das amostras NPM e NPM-NH <sub>2</sub> . ....	91
<b>Figura 31.</b> Curva de potencial zeta em função do pH (2-12) para as amostras NPM e NPM-NH <sub>2</sub> em água. ....	92
<b>Figura 32.</b> Distribuição de tamanho da amostra NPM (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> ) obtidos por meio da medida de espalhamento dinâmico de luz em diferentes meios: água destilada e meio de cultura com SFB. ....	93

<b>Figura 33.</b> Curvas de magnetização para as amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH <sub>2</sub> ) com suas respectivas ampliações da curva de histerese em função do campo magnético aplicado a 300 K.....	95
<b>Figura 34.</b> Perfil de liberação de calor das nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH <sub>2</sub> ) – 10 mg/mL (em água), sob aplicação de um campo magnético a 275 Oe e 224 KHz.....	96
<b>Figura 35.</b> Ensaio de viabilidade celular (MTT) das amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH <sub>2</sub> ) nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000 µg/mL. ....	98
<b>Figura 36.</b> Interação da amostra NPM-NH <sub>2</sub> com células mesenquimais de mamífero realizada nos tempos de 1, 2 e 3 h em concentrações de 1,5, 2,5 e 4,5 µg/mL. ....	99
<b>Figura 37.</b> Citotoxicidade/internalização NPM-NH <sub>2</sub> -Rod em fibroblastos (BalbC)...	100
<b>Figura 38.</b> Ensaio de viabilidade tempo dependente de Presto Blue realizado após exposição de 100 µg/mL de nanopartículas, com campo magnético alternado aplicado em 5 ciclos repetidos. Os resultados são a média ± desvio padrão de uma triplicata experimental. ....	101
<b>Figura 39.</b> Ensaio <i>live and dead</i> após aplicação de campo magnético (15,5 KA m <sup>-1</sup> e f 307 KHz). Células tumorais (A549) foram expostas a 100 µg/mL de NPM-NH <sub>2</sub> . O controle foi exposto a 1% de SDS 30 min antes da realização do ensaio .....	102
<b>Figura 40.</b> Representação esquemática do uso de nanomateriais em nanomedicina teranóstica: a combinação de várias estruturas em nanocarreadores multifuncionais permite seu uso em diagnóstico por imagem e abordagens terapêuticas. ....	107
<b>Figura 41.</b> Conversão de monômeros (MMA e AA) no polímero puro PMMA (P) e copolímero P(MMA-co-AA) (PP), na presença de curcumina (P <sub>c</sub> e PP <sub>c</sub> ) e na presença de SPION + curcumina (M@ P <sub>c</sub> e M@PP <sub>c</sub> ) em função do tempo para polimerização em miniemulsão. ....	117
<b>Figura 42.</b> Padrão de difração de raios X (DRX) para a estrutura cristalina do SPION (linha preta) e para os nanossistemas (amorfos) P (linha azul), PP (linha verde), P <sub>c</sub> (linha amarela), PP <sub>c</sub> (linha laranja), M@P <sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP <sub>c</sub> (linha vinho). ....	119
<b>Figura 43.</b> Espectros de FTIR obtidos para os nanossistemas SPION (linha preta), P (linha azul), PP (linha verde), P <sub>c</sub> (linha amarela), PP <sub>c</sub> (linha laranja), M@P <sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP <sub>c</sub> (linha vinho).....	121

<b>Figura 44.</b> Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e termogravimétricas derivadas (DTG) para SPION (linha preta) e os nanossistemas P (linha azul), PP (linha verde), Pc (linha amarela), PPc (linha laranja), M@P <sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP <sub>c</sub> (linha vinho)	122
<b>Figura 45.</b> Imagens de MET dos nanossistemas M@P <sub>c</sub> (A - baixa magnificação e B - alta magnificação) e M@PP <sub>c</sub> (C - baixa magnificação e D - alta magnificação). .....	123
<b>Figura 46.</b> Imagens de MEV para os nanossistemas M@P <sub>c</sub> (A) e M@PP <sub>c</sub> (E) e imagens de mapeamento elementar de carbono (B e F), ferro (C e G) e oxigênio (D e H) representados nas cores vermelha, roxa e azul, respectivamente. ....	124
<b>Figura 47.</b> Magnetização em função do campo magnético aplicado a 300 K para amostras SPION (linha preta), M@P <sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP <sub>c</sub> (linha vinho). A inserção à direita mostra uma ampliação em torno do campo zero a 300 K para todas as amostras.....	125
<b>Figura 48.</b> Curvas de temperatura em função do tempo obtidas para os nanossistemas SPION (linha preta), M@P <sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP <sub>c</sub> (linha vinho) (concentração de 0,9, 90 e 90 mg/mL, respectivamente) sob aplicação de um campo de 596 (200 A) Oe e 226 KHz.....	127
<b>Figura 49.</b> Microscopia de fluorescência dos nanossistemas em pó, com excitação em diferentes regiões do espectro eletromagnético: azul ( $\lambda_{ex} = 350$ nm; $\lambda_{em} = 380$ nm), verde ( $\lambda_{ex} = 488$ nm; $\lambda_{em} = 520$ nm) e vermelho ( $\lambda_{ex} = 546$ nm; $\lambda_{em} = 620$ nm). ....	128
<b>Figura 50.</b> Ensaio de viabilidade celular (conversão do formazan após exposição ao MTT) com diferentes concentrações dos nanossistemas (10; 1,0 e 0,1 mg/mL). A análise é o resultado da média $\pm$ SD de três experimentos independentes. ....	129
<b>Figura 51.</b> Ensaio de internalização celular (SAOS-2 em lamínulas) - micrografia representativa. <b>A-</b> Coloração dos núcleos em azul (DAPI, primeira coluna), dos nanossistemas em verde ( $\lambda_{ex} = 488$ nm, segunda coluna) e o citoesqueleto em vermelho (coloração de faloidina, terceira coluna). A última coluna da Figura A (baixa ampliação) e a Figura <b>B</b> (alta ampliação) mostram imagens mescladas, com setas amarelas indicando a internalização dos nanossistemas. ....	131
<b>Figura 52.</b> Imagens obtidas por RMN pesadas em T1 e em T2, avaliando o efeito de NPMs dispersas em água.....	142
<b>Figura 53.</b> Medidas de relaxação T1 obtida por inversão-recuperação ( <b>A</b> ) e medidas de relaxação T2 obtida por intermédio do protocolo CPMG ( <b>B</b> ) para a NPMs dispersas em água.....	143
<b>Figura 54.</b> Imagens obtidas por RMN pesadas em T1 e em T2, avaliando o efeito de NPMs dispersas em ácido oleico. ....	144

<b>Figura 55.</b> Espectro normalizado do ácido oleico “puro” e com 0,1 mg/ml de nanopartículas magnéticas.....	145
<b>Figura 56.</b> Distribuição das NPMs em corpos de prova de silicone. A) Corpo de prova geral sem contraste e B) corpo de prova com contraste, realçando as diferentes concentrações de NPMs.....	147
<b>Figura 57.</b> Dispersão de NPMs - diferentes concentrações em fantasmas de silicone .	147
<b>Figura 58.</b> Interação de esferoides após 0h e 24h de exposição às NPMs em diferentes concentrações (100, 300 e 500 µg/mL). .....	149
<b>Figura 59.</b> Efeito da exposição cumulativa do campo magnético aos esferoides. ....	150
<b>Figura 60.</b> Distribuição de NPMs (em branco) em esferoides a partir de imagens de microCT representativas do corte central dos esferoides (em XY, XZ e YZ). .....	153
<b>Figura 61.</b> Volume ocupado pelas NPMs (A) e quantificação de NPMs (B) internalizadas pelos esferoides antes/depois da aplicação do campo magnético alternado.....	154
<b>Figura 62.</b> Imagens de microCT de esferoides contrastados com Os-FeCNK. (A) Esferoide emblocado em resina e (B) identificação das NPMs limitadas pela estrutura do esferoide.....	158
<b>Figura 63.</b> Internalização das NPMs (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ) pelas células do esferoide celular (ctr, 300 µg/mL). As NPM são internalizadas pelo esferoide de forma maciça (A e B), localizando-se no interior da célula tanto livres no citoplasma, quanto envoltas por membrana (C, seta laranja, e D, seta amarela) e transitando entre as camadas de células (E, seta branca). .....	159
<b>Figura 64.</b> Esferoide exposto a 100 µg/mL de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> e a 4 ciclos de campo magnético. São observadas partículas de ferro internalizadas dentro de vesículas (setas amarelas) ou livres no citoplasma (setas laranjas). O esferoide mostra perda de integridade estrutural (setas azuis). .....	160
<b>Figura 65.</b> Esferoide exposto a 300 µg/mL de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> . Exposição a 1 (A-D) e 4 (E-H) ciclos de aplicação de campo magnético alternado.....	161
<b>Figura 66.</b> Esferoide exposto a 500 µg/mL de Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> . Exposição a 1. (A-D) e 4 (E-G) ciclos de aplicação de campo magnético.....	163

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Revisão da literatura de trabalhos envolvendo polímeros e curcumina.....	35
<b>Tabela 2.</b> Revisão da literatura de trabalhos envolvendo nanopartículas fluorescentes e magnéticas .....	39
<b>Tabela 3.</b> Revisão da literatura com trabalhos envolvendo teranóstico empregando SPION.....	42
<b>Tabela 4.</b> Revisão da literatura de trabalhos envolvendo teranóstico clínico com nanopartículas superparamagnéticas. ....	43
<b>Tabela 5.</b> Etapas e equações do mecanismo de polimerização do MMA com extrato de cúrcuma. ....	53
<b>Tabela 6.</b> Intervalo de variação das variáveis de entrada do planejamento fatorial completo a três níveis .....	54
<b>Tabela 7.</b> Plano experimental fatorial completo a três níveis.....	54
<b>Tabela 8.</b> Variáveis de entrada normalizadas e respectivas variáveis de saída para os experimentos correspondentes ao planejamento experimental proposto. ....	68
<b>Tabela 9.</b> Análise estatística dos erros nos pontos centrais .....	69
<b>Tabela 10.</b> Matriz de correlações entre variáveis de entrada e saída do Planejamento Experimental.....	70
<b>Tabela 11.</b> Diâmetro médio de cristalitos estimados pela equação de Scherrer e seus respectivos parâmetros de cálculo .....	89
<b>Tabela 12.</b> Diâmetro hidrodinâmico para as amostras NPM e NPM-NH <sub>2</sub> para os diferentes meios utilizados: água e meio de cultura com SFB .....	94
<b>Tabela 13.</b> Valores obtidos para magnetização de saturação (M <sub>s</sub> ), magnetização remanescente (M <sub>r</sub> ) e campo coercivo (H <sub>c</sub> ) das amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH <sub>2</sub> ).....	96
<b>Tabela 14.</b> Valores obtidos para a taxa de absorção específica (SAR) e perda de potência específica (ILP) para as amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH <sub>2</sub> ) na concentração de 10 mg/mL (em água) .....	97
<b>Tabela 15.</b> Proporções mássicas de reagentes empregados na polimerização de P(MMA-co-AA) por miniemulsão direta.....	111
<b>Tabela 16.</b> Tamanho hidrodinâmico ( $\phi_H$ ), potencial zeta ( $\xi$ ), índice de polidispersão (PDI) e massa molar ponderal média das amostras (Mw) em água deionizada (pH = 5,5). ..	118

<b>Tabela 17.</b> Parâmetros magnéticos obtidos para os nanossistemas SPION, M@P <sub>c</sub> e M@PP <sub>c</sub> .....	126
<b>Tabela 18.</b> Valores das constantes obtidas a partir das medidas de relaxação das NPMs em água.....	143

## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Estrutura da tese.....	8
<b>Esquema 2.</b> Provável mecanismo de degradação da curcumina (favorecido por meio aquoso e catalisado por íons OH <sup>-</sup> ).....	58
<b>Esquema 3.</b> Síntese dos nanomateriais: PMMA (P), PMMA_C (Pc), SPION@PMMA_C (M@Pc), P(MMA-co-AA) (PP), P(MMA-co-AA)_C (PPc) e SPION@P(MMA-co-AA)_C (M@PPc).....	109

## LISTA DE APÊNDICES

<b>Apêndice A</b> - Modelagem cinética fenomenológica da polimerização do PMMA em presença de cúrcuma.....	199
<b>Apêndice B</b> - Reparametrização do planejamento fatorial completo a três níveis .....	208

## LISTA DE ANEXOS

<b>ANEXOS CAPÍTULO III.....</b>	<b>211</b>
<b>Anexo A - Caracterizações amostras planejamento experimental .....</b>	<b>211</b>
<b>Figura A-1:</b> Curvas cinéticas para os experimentos de polimerização em massa, em que foram variados o teor de iniciador e a carga de extrato de cúrcuma, compondo o planejamento experimental completo 3 <sup>2</sup> .....	211
<b>Figura A-2:</b> Espectros de absorção das amostras do planejamento experimental completo 3 <sup>2</sup> , solubilizadas em THF (4,5 mg g <sup>-1</sup> ).....	211
<b>Figura A-3:</b> Espectros de emissão (excitação a 352 nm) das amostras do planejamento experimental completo 3 <sup>2</sup> , solubilizadas em THF (4,5 mg g <sup>-1</sup> ).....	212
<b>Anexo B - Análises detalhadas dos ajustes do modelo empírico .....</b>	<b>213</b>
<b>Tabela B-1:</b> Parâmetros de modelo estimados para rendimentos (Y <sub>10</sub> ) .....	213
<b>Figura B-1:</b> Valores de rendimento (Y <sub>10</sub> ) previstos e calculados.....	213
<b>Figura B-2:</b> Superfície de resposta para rendimento (Y <sub>10</sub> ) .....	213
<b>Figura B-3:</b> Níveis de resposta para rendimentos (Y <sub>10</sub> ) .....	214
<b>Tabela B-2:</b> Parâmetros de modelo estimados para fluorescência (A <sub>max</sub> ).....	214
<b>Figura B-4:</b> Valores de fluorescência (A <sub>max</sub> ) previstos e calculados .....	214
<b>Figura B-5:</b> Superfície de resposta para fluorescência (A <sub>max</sub> ).....	215
<b>Figura B-6:</b> Níveis de resposta para fluorescência (A <sub>max</sub> ).....	215
<b>Anexo C - Validação da síntese .....</b>	<b>216</b>
<b>Figura C-1:</b> Aspecto visual da miniemulsão com 1,0% de SPIONs: (a) pré-emulsão; (b) pós-emulsão e repouso, (c) pós-emulsão e polimerização. A concentração de 1,0% de SPIONs (em relação ao monômero) mantém a estabilidade da fase aquosa/orgânica ao incorporar os SPIONs à matriz polimérica .....	216
<b>Anexo D - Ensaios biológicos .....</b>	<b>216</b>
<b>Figura D-1:</b> Micrografia óptica após 24 h de exposição dos nanossistemas M@P <sub>c</sub> e M@PP <sub>c</sub> à linhagem celular SAOS2.....	216

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>CAPÍTULO I Materiais Nanoestruturados Multifuncionais: um Universo de Possibilidades para a Medicina Oncológica .....</b>	<b>1</b>
1.1.	Estado da Arte.....	2
1.2.	Objetivos .....	7
1.2.1.	Objetivo Geral.....	7
1.2.2.	Objetivos específicos .....	7
1.3	Laboratórios envolvidos .....	8
1.4	Estrutura da tese .....	8
<b>2</b>	<b>CAPÍTULO II Introdução: Fundamentação Teórica e Revisão da Literatura. 11</b>	
2.1	Introdução .....	12
2.2	Fundamentação Teórica.....	13
2.2.1	Polímeros: conceitos e propriedades de materiais.....	13
2.2.1.1	<i>Polimerização em cadeia via radicais livres</i> .....	13
2.2.1.2	<i>Polimerização do macro ao nano</i> .....	15
2.2.2	Fluorescência: conceitos e propriedades de materiais.....	17
2.2.2.1	<i>Propriedades fotofísicas da curcumina</i> .....	17
2.2.2.2	<i>Conceitos fundamentais de fluorescência</i> .....	19
2.2.3	Magnetismo: conceitos e propriedades de materiais.....	21
2.2.3.1	<i>Magnetismo do macro ao nano</i> .....	21
2.2.3.2	<i>Diagnóstico por imagem (RMN e TC)</i> .....	23
2.2.3.3	<i>Tratamento por hipertermia magnética</i> .....	31
2.3	Revisão da Literatura .....	34
2.3.1	Polímeros fluorescentes e curcuminoides .....	34
2.3.2	Nanopartículas fluorescentes e magnéticas .....	38
2.3.3	Teranóstico com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro.....	41
<b>3</b>	<b>CAPÍTULO III Desenvolvimento de Material Polimérico Fluorescente Contendo Extrato de Cúrcuma.....</b>	<b>46</b>
3.1	Contextualização .....	47
3.2	Materiais e métodos .....	49
3.2.1	Especificação dos insumos .....	49
3.2.2	Obtenção do extrato de cúrcuma .....	49

3.2.3	Estabilidade do extrato de cúrcuma em solventes e monômeros .....	50
3.2.4	Reações de polimerização em massa.....	50
3.2.5	Caracterizações de distribuição de massas molares .....	51
3.2.6	Estabilidade em estado sólido .....	51
3.2.7	Modelagem fenomenológica .....	52
3.2.8	Modelagem empírica.....	53
<b>3.3</b>	<b>Resultados e discussão .....</b>	<b>55</b>
3.3.1	Estabilidade do extrato de cúrcuma em solução .....	55
3.3.2	Cinética de polimerização na presença de extrato de cúrcuma .....	60
3.3.3	Fotoestabilidade em estado sólido do polímero fluorescente.....	62
3.3.4	Modelagem fenomenológica da polimerização em massa do sistema MMA na presença de extrato de cúrcuma .....	66
3.3.5	Modelagem empírica da polimerização em massa do sistema (MMA-co-AA) em presença de extrato de cúrcuma .....	68
<b>3.4</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>73</b>
<b>3.5</b>	<b>Cooperações técnicas e produções científicas.....</b>	<b>74</b>
3.5.1	Colaborações .....	74
3.5.2	Orientações .....	74
3.5.3	Produções científicas .....	74
<b>4</b>	<b>CAPÍTULO IV Desenvolvimento de Nanopartículas Magnéticas com Modificação de Superfície.....</b>	<b>76</b>
<b>4.1</b>	<b>Contextualização .....</b>	<b>77</b>
<b>4.2</b>	<b>Materiais e métodos .....</b>	<b>80</b>
4.2.1	Especificação dos insumos .....	80
4.2.2	Síntese de nanopartículas superparamagnéticas (SPION-NPM).....	80
4.2.3	Funcionalização dos SPIONs com aminosilano (NPM-NH <sub>2</sub> ).....	81
4.2.4	Conjugação de rodamina isotilcianato (NCS) em SPIONs (NPM-NH <sub>2</sub> _Rod). 81	
4.2.5	Caracterizações físico-químicas .....	82
4.2.5.1	<i>Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico .....</i>	82
4.2.5.2	<i>Difração de raios X.....</i>	82
4.2.5.3	<i>Microscopia eletrônica de transmissão .....</i>	83
4.2.5.4	<i>Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier .....</i>	83
4.2.5.5	<i>Magnetometria de amostra vibrante.....</i>	83
4.2.5.6	<i>Hipertermia magnética .....</i>	83

4.2.6	Ensaio biológicos.....	84
4.2.6.1	<i>Cultivo de células</i> .....	84
4.2.6.2	<i>Exposição das células às nanopartículas</i> .....	85
4.2.6.3	<i>Interação celular com as nanopartículas</i> .....	85
4.2.6.4	<i>Confirmação de internalização por microscopia de fluorescência</i> .....	86
4.2.6.5	<i>Hipertermia magnética em modelo celular 2D</i> .....	86
4.2.6.6	<i>Viabilidade celular (ensaio MTT)</i> .....	86
4.2.6.7	<i>Viabilidade celular (Presto Blue)</i> .....	87
4.2.6.8	<i>Citotoxicidade (Live and dead)</i> .....	87
<b>4.3</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>87</b>
4.3.1	Efeito de modificação de superfície em nanopartículas magnéticas.....	87
4.3.2	Citotoxicidade e internalização dos nanossistemas magnéticos.....	98
4.3.3	Prova de conceito da hipertermia magnética em modelo celular 2D.....	100
<b>4.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>103</b>
<b>4.5</b>	<b>Cooperações técnicas e produções científicas</b> .....	<b>103</b>
4.5.1	Colaborações .....	103
4.5.2	Orientações .....	104
4.5.3	Produções científicas .....	104
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO V Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas Contendo Extrato de Cúrcuma e Nanopartículas Superparamagnéticas</b> .....	<b>105</b>
<b>5.1</b>	<b>Contextualização</b> .....	<b>106</b>
<b>5.2</b>	<b>Materiais e Métodos</b> .....	<b>110</b>
5.2.1	Especificação dos insumos .....	110
5.2.2	Métodos .....	110
5.2.2.1	<i>Síntese das nanopartículas magnéticas (SPIONs)</i> .....	110
5.2.2.2	<i>Síntese das nanopartículas poliméricas</i> .....	110
5.2.2.3	<i>Adição da curcumina à base polimérica</i> .....	111
5.2.2.4	<i>Obtenção dos nanossistemas multifuncionais</i> .....	112
5.2.3	Caracterização dos nanossistemas.....	112
5.2.3.1	<i>Cromatografia de permeação em gel (GPC)</i> .....	112
5.2.3.2	<i>Potencial zeta e Diâmetro hidrodinâmico (DLS)</i> .....	112
5.2.3.3	<i>Difração de raios X (DRX)</i> .....	112
5.2.3.4	<i>Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier</i> .....	113
5.2.3.5	<i>Termogravimetria (TGA)</i> .....	113

5.2.3.6	<i>Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV)</i> ..	113
5.2.3.7	<i>Magnetometria de amostra vibrante (VSM)</i> .....	113
5.2.3.8	<i>Hipertermia magnética</i> .....	114
5.2.3.9	<i>Caracterização das propriedades fluorescentes</i> .....	114
5.2.4	Ensaio biológicos .....	115
5.2.4.1	<i>Exposição celular</i> .....	115
5.2.4.2	<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	115
5.2.4.3	<i>Ensaio de internalização</i> .....	115
<b>5.3</b>	<b>Resultados e discussão</b> .....	<b>116</b>
5.3.1	Síntese dos nanossistemas contendo polímero, curcumina e SPIONS .....	116
5.3.2	Validação multifuncional: propriedades magnéticas e fluorescentes.....	124
5.3.3	Ensaio biológicos .....	128
5.3.3.1	<i>Ensaio de citotoxicidade</i> .....	128
5.3.3.2	<i>Ensaio de internalização</i> .....	130
<b>5.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>132</b>
<b>5.5</b>	<b>Cooperações técnicas e produções científicas</b> .....	<b>132</b>
5.5.1	Colaborações .....	132
5.5.2	Orientações .....	133
5.5.3	Produções científicas .....	133
<b>6</b>	<b>CAPÍTULO VI Validação do Potencial Teranóstico de Nanopartículas Superparamagnéticas em Modelos Tumoriais de Esferoides Celulares</b> .....	<b>134</b>
<b>6.1</b>	<b>Contextualização</b> .....	<b>135</b>
<b>6.2</b>	<b>Materiais e métodos</b> .....	<b>137</b>
6.2.1	Síntese de nanopartículas de óxido de ferro (SPIONS) .....	137
6.2.2	Comparação entre ressonância magnética nuclear e microCT .....	137
6.2.2.1	<i>Ressonância magnética nuclear</i> .....	138
6.2.2.2	<i>MicroCT</i> .....	138
6.2.3	Cultura de células 3D .....	139
6.2.4	Exposição dos esferoides aos SPIONS (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -NH <sub>2</sub> ) .....	139
6.2.5	Aplicação de campo magnético alternado .....	139
6.2.6	Fixação e pós-fixação de esferoides .....	140
6.2.7	Análise de esferoides .....	140
6.2.7.1	<i>Análise por microCT</i> .....	140
6.2.7.2	<i>Análise de fluorescência</i> .....	140

6.2.7.3	<i>Análise de MET</i> .....	140
6.2.7.4	<i>Quantificação de SPIONs internalizados</i> .....	141
<b>6.3</b>	<b>Resultados e Discussão</b> .....	<b>141</b>
6.3.1	Comparação entre RMN e microCT .....	141
6.3.1.1	<i>Imageamento por Ressonância Magnética Nuclear</i> .....	141
6.3.1.2	<i>Imageamento por microCT</i> .....	146
6.3.1.3	<i>Considerações comparativas entre técnicas de RMN e microCT</i> .....	148
6.3.2	Interação de NPMs com esferoides 3D .....	148
6.3.3	Efeito morfológico após aplicação de campo magnético: potencial terapêutico de NPMs .....	149
6.3.4	Distribuição de partículas por análise de microCT: potencial diagnóstico de NPMs .....	151
6.3.5	Internalização e distribuição de NPs em esferoides: análise morfológica ultraestrutural (MET).....	158
<b>6.4</b>	<b>Conclusão</b> .....	<b>165</b>
<b>6.5</b>	<b>Cooperações técnicas produções científicas</b> .....	<b>166</b>
6.5.1	Colaborações .....	166
6.5.2	Orientações .....	166
6.5.3	Produções científicas .....	166
<b>7</b>	<b>CAPÍTULO VII Considerações Finais e Propostas para Trabalhos Futuros</b> .	<b>167</b>
7.1	<b>Considerações finais</b> .....	<b>168</b>
7.2	<b>Propostas para trabalhos futuros</b> .....	<b>171</b>
7.3	<b>Captação de recursos de fomento a inovação</b> .....	<b>172</b>
7.3.1	Projetos como coordenador da proposta .....	172
7.3.2	<i>Projetos como apoiador/colaborador da proposta</i> .....	173
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>178</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>198</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>210</b>

# 1 CAPÍTULO I

## Materiais Nanoestruturados

### Multifuncionais: um Universo de Possibilidades para a Medicina Oncológica

Eu fico com a pureza  
Da resposta das crianças  
É a vida, é bonita  
E é bonita

Viver  
E não ter a vergonha  
De ser feliz  
Cantar e cantar e cantar  
A beleza de ser  
Um eterno aprendiz

Ah meu Deus!  
Eu sei, eu sei  
Que a vida devia ser  
Bem melhor e será  
Mas isso não impede  
Que eu repita  
É bonita, é bonita  
E é bonita

Viver  
E não ter a vergonha  
De ser feliz  
Cantar e cantar e cantar  
A beleza de ser  
Um eterno aprendiz

Ah meu Deus!  
Eu sei, eu sei  
Que a vida devia ser  
Bem melhor e será  
Mas isso não impede  
Que eu repita  
É bonita, é bonita

E é bonita  
  
E a vida  
E a vida o que é?  
Diga lá, meu irmão  
Ela é a batida de um coração  
Ela é uma doce ilusão  
Êh! Ôh!

E a vida  
Ela é maravilha ou é  
sofrimento?  
Ela é alegria ou lamento?  
O que é? O que é?  
Meu irmão

Há quem fale  
Que a vida da gente  
É um nada no mundo  
É uma gota, é um tempo  
Que nem dá um segundo

Há quem fale  
Que é um divino  
Mistério profundo  
É o sopro do criador  
Numa atitude repleta de  
amor

Você diz que é luta e prazer  
Ele diz que a vida é viver  
Ela diz que melhor é morrer  
Pois amada não é  
E o verbo é sofrer

Eu só sei que confio na moça  
E na moça eu ponho a força  
da fé  
Somos nós que fazemos a  
vida  
Como der, ou puder, ou  
quiser

Sempre desejada  
Por mais que esteja errada  
Ninguém quer a morte  
Só saúde e sorte

E a pergunta roda  
E a cabeça agita  
Eu fico com a pureza  
Da resposta das crianças  
É a vida, é bonita  
E é bonita

Viver  
E não ter a vergonha  
De ser feliz  
Cantar e cantar e cantar  
A beleza de ser  
Um eterno aprendiz

Ah meu Deus!  
Eu sei, eu sei  
Que a vida devia ser  
Bem melhor e será  
Mas isso não impede  
Que eu repita  
É bonita, é bonita  
E é bonita

O Que É, O Que É? (Gonzaguinha)

## 1.1. Estado da Arte

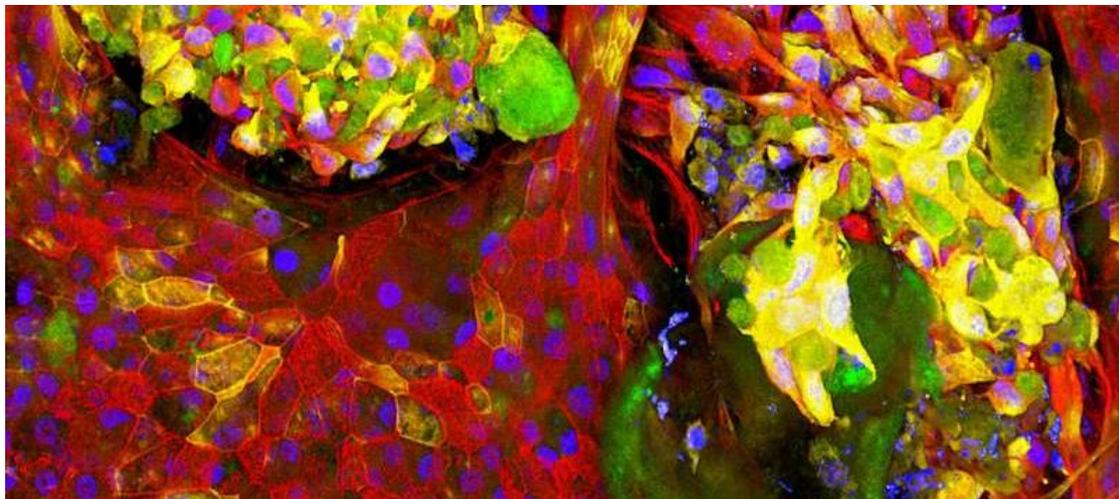
De acordo com o relatório mais recente da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer, da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é uma das principais causas de morbidade e mortalidade, com aproximadamente 19,3 milhões de novos casos e 10 milhões de mortes relacionadas em 2020, afetando populações em todos os países do mundo (*World Health Organization, 2022*). Segundo o relatório do INCA “Estimativa 2023 - Incidência de Câncer no Brasil”, estima-se para o triênio 2023-2025 a ocorrência de 704 mil casos novos de câncer por ano. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de pele não melanoma, mama feminina, próstata, colorretal, pulmão e estômago e entre os mais incidentes (INCA, 2022).

Estudos avançados sobre câncer revelam que esta é uma das doenças humanas mais complexas e insidiosas. Por exemplo, pode ser observado na Figura 1 que o tecido pulmonar saudável (vermelho) envolve células que expressam marcadores tipicamente encontrados em células cancerosas e saudáveis (verde e amarelo, respectivamente), indicando a complexidade da relação entre células normais e cancerosas. Em azul pode ser observada a marcação do núcleo celular. Dentre as razões para tal afirmação, destacam-se as seguintes: (i) o câncer pode ser induzido por uma série de fatores, como infecção viral, exposição a produtos químicos, bem como por configurações genéticas indesejadas; (ii) por se tratar de uma disfunção das células do próprio organismo, dificulta tratamentos seletivos às células cancerígenas, poupando as saudáveis; (iii) quando induzido por mutações genéticas, o câncer pode parar de crescer e permanecer inativo por anos, sugerindo que há mais fatores indutores; (iv) o câncer apresenta uma série de particularidades que lhe permite burlar o sistema imunológico do corpo, deixando-o crescer sem ser detectado e de forma descontrolada (BROWNELL, 2019).

Os tratamentos oncológicos empregados entre os séculos XIX e XX apresentavam, primordialmente, abordagens invasivas e agressivas, como cirurgia, radioterapia e quimioterapia, que estão relacionados a efeitos colaterais traumáticos. Com o avanço do conhecimento da doença e advento de vários tipos de tecnologias, ocorreu uma mudança de paradigma nas propostas de métodos de tratamento de tumores. Neste contexto, uma onda de novas estratégias terapêuticas - incluindo imunoterapia, nanotecnologia e medicina personalizada - está dando esperança aos pacientes para os quais os tratamentos tradicionais falharam e oferecendo o potencial de tratamentos mais

eficazes e menos invasivos, que promovam a cura da doença ou o prolongamento da vida do paciente com qualidade e bem estar (BROWNELL, 2019; ROEMELING *et al.*, 2017).

**Figura 1.** Microscopia de fluorescência de tecido pulmonar contendo células tumorais.

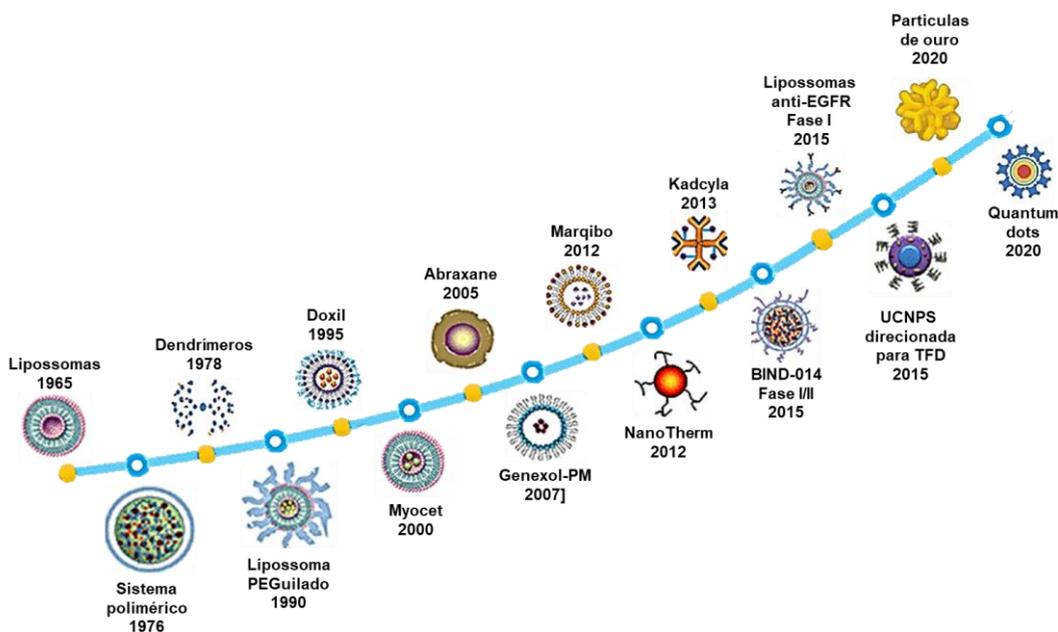


Fonte: *Wyss Institute at Harvard University.*

A nanomedicina do câncer é uma das áreas mais proeminentes neste campo, já que os nanomedicamentos são geralmente destinados como sistemas de entrega miniaturizados, também chamados nanocarreadores, nanoterapêuticos ou *nanodrugs*. Estes medicamentos visam melhorar a eficácia terapêutica dos agentes quimioterápicos atualmente disponíveis, combinando-os com um componente de entrega em nanoescala. No entanto, ainda há potencial para o uso de nanomateriais em oncologia no segmento de diagnósticos, teranósticos (capaz de integrar de diagnóstico e tratamento em uma única plataforma) e, mais recentemente, novas terapias, como a possibilidade de melhorar a especificidade do alvo e/ou a penetração tecidual, permitindo assim a detecção precoce da malignidade de um tumor (BREGOLI *et al.*, 2016; TRAN *et al.*, 2017).

Na Figura 2 são apresentados os desenvolvimentos recentes no uso de nanomateriais no tratamento de câncer. Cada categoria de nanomateriais apresenta pontos fortes e limitações únicas, mas todas já possuem comprovada aplicabilidade para o tratamento de tumores. Com características biológicas distintas, os nanomateriais podem melhorar o efeito de permeabilidade e retenção, aumentar a biodisponibilidade, reduzir a toxicidade de drogas quimioterápicas, liberar drogas quimioterápicas hidrofóbicas ou hidrofílicas na corrente sanguínea e apresentar efeitos citotóxicos contra as células cancerígenas (LI *et al.*, 2017).

**Figura 2.** Linha do tempo de avanço no desenvolvimento da nanomedicina.



Fonte: Adaptado de LI *et al.* (2017) e NIRMALA *et al.* (2023).

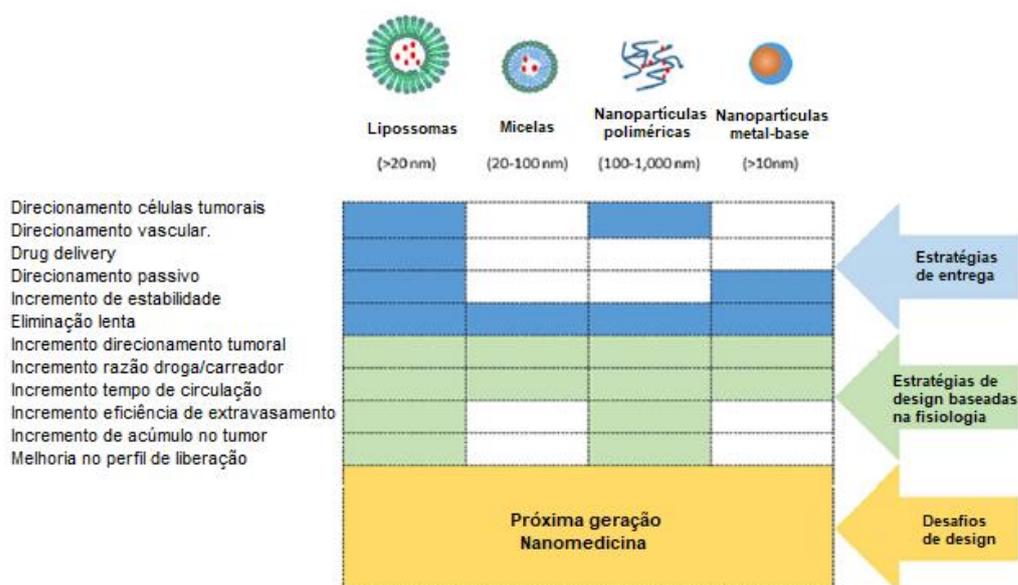
Lipossomas, sistemas poliméricos e dendrímeros foram desenvolvidos como transportadores de fármacos em nanoescala na fase inicial das descobertas (antes de 1995). Doxil (doxorubicina) foi o primeiro sistema lipossômico aprovado pela FDA (*Food and Drug Administration*) para uso no tratamento de câncer nos Estados Unidos. Com o desenvolvimento da nanomedicina, foram aprovados para uso clínico também sistemas lipossômicos não peguilados Myocet (doxorubicina); nanopartículas à base de albumina Abraxane (doxorubicina); sistemas micelares poliméricos à base de PEG-PLA Genexol-PM (paclitaxel); sistemas lipossômicos à base de sulfato de vincristina Marqibo; nanopartículas de óxido de ferro NanoTherm; e sistemas lipossômicos Kadcylla, que apresentam um conjugado anticorpo-fármaco, constituído pelo anticorpo monoclonal humanizado trastuzumab ligado covalentemente ao agente citotóxico DM1. Estudos com nanopartículas poliméricas à base de PEG-PLGA (BIND-014) completaram os ensaios clínicos de fase II em cânceres avançados, enquanto estudos com os imunolipossomas do receptor do fator de crescimento epidérmico (anti-EGFR) estão em fase II de ensaios clínicos de recrutamento de câncer de mama. As propriedades físicas das nanopartículas de *photon upconversion*<sup>1</sup> (UCNPs) utilizadas na terapia fotodinâmica também

<sup>1</sup>*Photon upconversion* é um processo no qual a absorção sequencial de dois ou mais fótons leva à emissão de luz em comprimento de onda menor que o comprimento de onda de excitação.

representam uma direção promissora para pesquisas futuras, pois sob excitação de luz infravermelha próxima, podem ativar moléculas fotossensibilizadoras para produzir EROs (Espécies Reativas de Oxigênio) e matar células cancerígenas (LI *et al.*, 2017). Por fim, artigos recentes relatam os avanços no uso de nanopartículas de ouro e *quantum dots* aplicados em teranóstica (NIRMALA *et al.*, 2023).

Os desafios para a nova geração de nanomateriais a serem desenvolvidos para a nanomedicina oncológica estão resumidos na Figura 3, junto a estratégias de entrega sítio-dirigida e estratégias de *design* de nanoestruturas. Sistemas lipossômicos estão sendo desenvolvidos para todas as estratégias de entrega (direcionamento passivo e ativo<sup>2</sup> de células tumorais ou endoteliais e desencadeamento de liberação de medicamentos). Sistemas micelares estão sendo desenvolvidos principalmente para entrega passiva de medicamentos, enquanto as nanopartículas poliméricas estão sendo usadas para entrega passiva e ativa.

**Figura 3.** Estratégias de entrega sítio-dirigida, estratégias de *design* e desafios da próxima geração para diferentes plataformas em nanomedicina oncológica.



Fonte: Adaptado de BREGOLI *et al.* (2016).

<sup>2</sup>Tipos de direcionamento para entrega de nanopartículas ao tecido tumoral: (i) o direcionamento passivo depende do fenestramento vascular intrínseco à região tumoral, permitindo que as nanopartículas percorram as fenestrações e atinjam os tumores; (ii) o direcionamento ativo pode ser usado quando nanopartículas apresentam funcionalidades na superfície que podem reconhecer e ligar receptores que estão superexpressos nas células tumorais; (iii) a liberação controlada ocorre quando a droga é liberada com velocidade controlada ou quando as nanopartículas são expostas a um estímulo externo, como um campo magnético ou luz (TRAN *et al.*, 2017; VIEIRA; GAMARRA, 2016).

Nanopartículas à base de metais estão sendo desenvolvidas principalmente para entrega passiva e liberação pulsada de medicamentos (terapia térmica). Estas plataformas aumentam a estabilidade sanguínea e prolongam o tempo de eliminação, em comparação com os fármacos convencionais, ao passo que o acúmulo intratumoral e a proporção fármaco/carreador são superiores para os sistemas constituídos por lipossomas e nanopartículas poliméricas. Os principais desafios de *design* que os *designers* da próxima geração de nanomedicina oncológica irão enfrentar são a eliminação mais eficiente dos nanossistemas pelo organismo, o incremento no acúmulo seletivo destes em células tumorais e o melhor perfil de liberação de fármacos (no caso em que estes nanossistemas atuem como carreadores) (BREGOLI *et al.*, 2016; VALLABANI; SINGH, 2018; WU; HUANG, 2017; DAMASCO *et al.*, 2020).

Tendo em vista o exposto, a tese apresentada propõe o *design* de nanossistemas visando aplicações médicas, como rastreamento celular e teranóstico tumoral. As nanoestruturas desenvolvidas foram compostas pela combinação das seguintes subestruturas:

(i) Nanopartículas superparamagnéticas: Estas incluem óxido de ferro (magnetita –  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) e possuem propriedades magnéticas que podem ser úteis em aplicações de diagnóstico e terapia por hipertermia.

(ii) Fluoróforo natural: O extrato de cúrcuma contém o fluoróforo curcumina que possui a capacidade de emitir fluorescência, desempenhando papel crucial para marcação e rastreamento de células e tecidos específicos.

(iii) Partículas poliméricas sintéticas: Utilizamos polímeros sintéticos, como homopolímero PMMA - poli(metacrilato de metila) e o copolímero P(MMA-co-AA) - poli(metacrilato de metila-co-ácido acrílico), que desempenham um papel importante na estrutura dos nanossistemas.

Os nanossistemas desenvolvidos foram caracterizados de forma abrangente, incluindo análises físico-químicas e, sempre que aplicável, medidas de suas propriedades magnéticas e fotoquímicas. Além disso, essas plataformas nanomédicinas foram avaliadas quanto à sua capacidade de fornecer contraste em imagem por ressonância magnética nuclear (RMN) e à sua habilidade de liberar calor quando expostas a um campo magnético alternado, um fenômeno conhecido como hipertermia magnética. Por fim, o

sistema mais promissor foi submetido a testes de validação para verificar sua capacidade de ser internalizado em células mesenquimais e esferoides celulares, tanto em células saudáveis quanto em células tumorais.

## **1.2. Objetivos**

### **1.2.1. Objetivo Geral**

O presente trabalho teve como objetivo geral o desenvolvimento de nanossistemas multifuncionais compostos por núcleos magnéticos revestidos com polímero fluorescente obtido por meio da polimerização com extrato de cúrcuma. Estes nanossistemas foram projetados visando aplicações biomédicas, tais como marcação e rastreamento celular via internalização, além de teranóstico tumoral, integrando as propriedades de diagnóstico e tratamento.

### **1.2.2. Objetivos específicos**

O objetivo geral foi consolidado por meio de realização dos seguintes objetivos específicos:

- 1) Estudo das propriedades fotofísicas do extrato de cúrcuma em solução (meios aquosos, solventes orgânicos e monômeros) e em matriz polimérica;
- 2) Avaliação do comportamento da emissão do fluoróforo quando incorporado em matrizes poliméricas de diferentes polaridades;
- 3) Estudo das alterações de propriedades de nanopartículas magnéticas (NPM) de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), quando submetida a procedimento de modificação de superfície;
- 4) Avaliação da interação, efeito citotóxico e internalização de nanossistemas magnéticos e/ou fluorescentes em modelos celulares 2D (monocamada) de células de mamífero;
- 5) Avaliação do potencial para rastreamento celular de nanossistemas contendo NPMs e fluoróforos encapsulados em nanopartículas poliméricas (NPP);
- 6) Avaliação da qualidade de imageamento, por ressonância magnética e tomografia computadorizada, na presença de nanopartículas magnéticas;

7) Validação do potencial de uso dos nanossistemas magnéticos em diagnóstico, empregando a técnica de microtomografia em modelos tumorais de esferoides (cultura celular 3D);

8) Validação do potencial de uso dos nanossistemas magnéticos em tratamento tumoral, via hipertermia magnética, sob aplicação de um campo magnético alternado externo, em modelos tumorais 2D (cultivo de células em monocamada) e 3D (esferoides celulares).

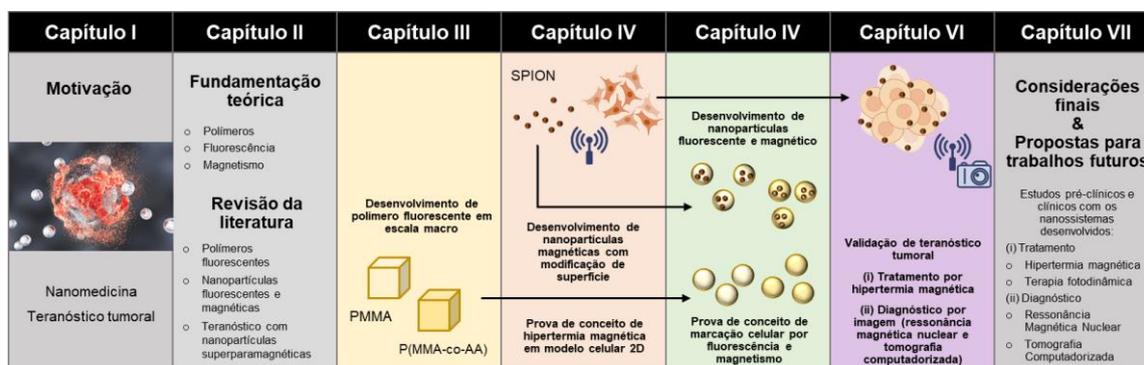
### 1.3 Laboratórios envolvidos

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Engenharia de Fenômenos Interfaciais (LABEFIT) e no Laboratório de Engenharia de Polímeros (EngePol), ambos do Programa de Engenharia Química (PEQ) do Instituto Alberto Luiz Coimbra de Pós-Graduação e Pesquisa de Engenharia (COPPE) da UFRJ, além do Laboratório de Nanotecnologia Biofuncional (LabNanoBiof) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Análises e caracterizações foram conduzidas em laboratórios, além da UFRJ, da Universidade Federal Fluminense (UFF) e do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF).

### 1.4 Estrutura da tese

O presente documento está organizado em sete capítulos, incluindo este capítulo introdutório. A seguir é feita uma breve descrição de cada capítulo que compõe esta tese, sendo que a estrutura lógica da apresentação é mostrada no Esquema 1.

Esquema 1. Estrutura da tese.



Fonte: Autoria própria.

No **Capítulo I** é exposto sumariamente o estado da arte, como motivação para o desenvolvimento deste trabalho, descrevendo a problemática do câncer a nível mundial e os avanços da nanomedicina que tendem a proporcionar soluções inovadoras e tecnológicas para aplicações teranósticas tumorais. Neste capítulo também são apresentados os objetivos e a viabilidade da tese.

O **Capítulo II** apresenta a fundamentação teórica e a revisão da literatura. A etapa de fundamentação teórica discute conceitos relacionados ao desenvolvimento de nanossistemas poliméricos, fluorescentes e magnéticos, bem como propriedades intrínsecas a tais materiais. Na etapa de revisão da literatura, as lacunas da literatura nesta área – desenvolvimento de nanoestruturas aplicadas à oncologia – são então apresentadas de maneira a embasar os objetivos do presente trabalho.

O **Capítulo III** apresenta o extrato de cúrcuma (fluoróforo natural) como candidato a marcador fluorescente, estudado quanto à estabilidade em solução (meios aquosos, solventes orgânicos e monômero) e após ser incorporado em matriz polimérica de poli(metacrilato de metila) (PMMA), puro e copolimerizado com ácido acrílico (P(MMA-co-AA)). Neste capítulo, a obtenção do polímero foi procedida pela metodologia de polimerização em massa e o efeito do extrato de cúrcuma na cinética de polimerização foi estudado por meio de um planejamento experimental fatorial completo, aliado a uma modelagem matemática fenomenológica. Além disso, um estudo de degradação fotoquímica do polímero fluorescente foi realizado, ilustrando o potencial do material para futuras aplicações biotecnológicas.

O **Capítulo IV** aborda sobre as nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) obtidas por coprecipitação e com a superfície modificada por um aminosilano. As referidas nanopartículas magnéticas (NPMs) foram caracterizadas quanto à morfologia, estrutura, propriedades interfaciais e propriedades magnéticas, além de avaliação da estabilidade coloidal em solução aquosa. Ensaio de internalização de nanopartículas magnéticas em células mesenquimais foram realizados, a fim de definir as condições ótimas para marcação destas células, visando ao posterior rastreamento celular. Além do ensaio com células mesenquimais, foi feito um estudo de citotoxicidade em células de mamíferos, saudáveis e tumorais, seguida de exposição a um campo magnético alternado, como prova de conceito para tratamento por hipertermia magnética.

O **Capítulo V** contempla o estudo de uma série de nanopartículas, compostas por combinações de nanopartículas poliméricas do homopolímero PMMA e do copolímero P(MMA-co-AA), na ausência e presença de extrato de cúrcuma e nanopartículas magnéticas de óxido de ferro. Todos os nanomateriais foram extensamente caracterizados físico-quimicamente, sendo avaliados os efeitos do extrato de cúrcuma e da nanopartícula magnética nas especificações do polímero (conversão, massa molar e tamanho da partícula, por exemplo). Os nanossistemas magnéticos fluorescentes desenvolvidos foram avaliados quanto ao potencial de rastreamento celular, sendo internalizados em células de mamíferos (ensaios de citotoxicidade também foram realizados).

O **Capítulo VI** avalia o potencial do nanossistema magnético em aplicações teranósticas tumorais. A nanoestrutura magnética, pré-validada no Capítulo IV, foi internalizada em esferoides celulares (modelo 3D) de células tumorais de mamífero. O emprego de esferoides celulares constitui uma alternativa promissora para mimetizar organismos vivos. O modelo biológico contendo nanopartículas magnéticas foi submetido à aplicação de um campo magnético alternado, visando à indução de hipertermia magnética. A interação das nanopartículas magnéticas com o modelo celular 3D foi investigada com diferentes concentrações de nanomateriais, permitindo elucidar a dinâmica partícula-célula, sob efeito combinado de concentração e aplicação de campo magnético alternado. Por intermédio de técnicas de caracterização baseadas em microtomografia associada a microscopia de transmissão, foi possível avaliar a dinâmica de internalização dos nanossistemas nos esferoides e a migração destas partículas no interior dos mesmos. Neste contexto, foi possível validar o potencial desses nanossistemas para diagnóstico por imagem e tratamento por hipertermia magnética.

Finalmente, no **Capítulo VII** são apresentadas as principais conclusões, inter-relacionando os resultados obtidos nos capítulos anteriores. Além das conclusões, são apresentadas também propostas para trabalhos futuros, como desdobramentos da presente tese.

A realização de diversas etapas deste trabalho foi conduzida em colaborações, que estão destacadas ao final de cada capítulo, junto a desdobramento de projetos vinculados a orientação de alunos em temas transversais à tese. Também são expostos ao final dos capítulos trabalhos apresentados em congressos científicos e aprovação de projetos de fomento à inovação, correlatos à esta tese.

## 2 CAPÍTULO II

# Introdução: Fundamentação Teórica e Revisão da Literatura

Estátuas e cofres e paredes  
pintadas  
Ninguém sabe o que  
aconteceu  
Ela se jogou da janela do  
quinto andar  
Nada é fácil de entender

Dorme agora  
É só o vento lá fora

Quero colo! Vou fugir de  
casa  
Posso dormir aqui com  
vocês?  
Estou com medo, tive um  
pesadelo  
Só vou voltar depois das três

Meu filho vai ter nome de  
santo  
Quero o nome mais bonito

É preciso amar as pessoas  
Como se não houvesse  
amanhã  
Porque se você parar pra  
pensar  
Na verdade não há

Me diz, por que que o céu é  
azul?  
Explica a grande fúria do  
mundo

São meus filhos  
Que tomam conta de mim

Eu moro com a minha mãe  
Mas meu pai vem me visitar  
Eu moro na rua, não tenho  
ninguém  
Eu moro em qualquer lugar

Já morei em tanta casa  
Que nem me lembro mais  
Eu moro com meus pais

É preciso amar as pessoas  
Como se não houvesse  
amanhã  
Porque se você parar pra  
pensar  
Na verdade não há

Sou uma gota d'água  
Sou um grão de areia  
Você me diz que seus pais  
não entendem  
Mas você não entende seus  
pais

Você culpa seus pais por  
tudo, isso é absurdo  
São crianças como você  
O que você vai ser  
Quando você crescer

Pais e Filhos (Marcelo Bonfá / Dado Villa-Lobos / Renato Russo)

## 2.1 Introdução

As áreas de nanotecnologia e biotecnologia têm sido identificadas nos últimos anos como prioritárias para o avanço tecnológico. Estas áreas são classificadas como estratégicas principalmente para o desenvolvimento de soluções inovadoras relacionadas à saúde humana. Neste contexto, uma tendência mundial é o desenvolvimento de sistemas teranósticos, que acumulam a funcionalidade de diagnóstico e tratamento, facilitando procedimentos médicos e melhorando a eficiência e seletividade de aplicações tradicionais. Por isso, cresce a necessidade de desenvolvimento de nanossistemas que acumulam funcionalidades, como fluorescência e magnetismo em um único material (DABROWSKA *et al.*, 2018).

O campo de nanopartículas magnéticas (NPMs) tem experimentado um progresso notável na área da oncologia nos últimos anos. As propriedades magnéticas intrínsecas das NPMs tornam estes materiais promissores como agentes de contraste para a ressonância magnética e/ou tomografia e agentes terapêuticos por hipertermia magnética induzida (CHO *et al.*, 2017; GOYA; ASÍN; IBARRA, 2013; JIN *et al.*, 2010; LI, J. *et al.*, 2015; LÓPEZ; TEJEIRO; RIVAS, 2013; PÉRIGO *et al.*, 2015; SHI *et al.*, 2015).

Nas últimas décadas, avanços em tecnologias de imagem transformaram o campo biomédico, possibilitando uma gama de aplicações da fluorescência como diagnóstico. Mais especificamente, os avanços nas áreas de química dos fluoróforos, desenvolvimento de imagens e de identificação de biomarcadores direcionáveis posicionaram a fluorescência intraoperatória como uma modalidade de detecção em tempo real altamente específica para cirurgias oncológicas (GARLAND; YIM; BOGYO, 2016). Desenvolvimentos de fluoróforos com características aprimoradas (aumento da fotoestabilidade em meio biológico e do rendimento quântico de fluorescência), instrumentação para detecção e estratégias de direcionamento levaram a testes clínicos, no início de 2010, dos primeiros fluoróforos direcionados para a área operatória de câncer (LI *et al.*, 2017). Reforçando esta aplicação, ZHANG *et al.* (2017) apontaram que, nos últimos anos, os esforços de pesquisa para desenvolver fluoróforos direcionados para imagens de tumores, juntamente com o surgimento de dispositivos aprimorados para detecção de fluorescência, vêm revolucionando o campo da cirurgia oncológica.

## 2.2 Fundamentação Teórica

Considerando o caráter multidisciplinar da presente tese e a proposta central de desenvolvimento de nanossistema multifuncional, a fundamentação teórica sobre os materiais e suas propriedades está organizada em três partes, a saber: (i) polímeros, (ii) fluorescência e (iii) magnetismo. Nestas, são abordados conceitos e propriedades de materiais, correlato a cada grande área.

### 2.2.1 Polímeros: conceitos e propriedades de materiais

Polímeros apresentam grande versatilidade para o *design* de nanoestruturas para aplicações biotecnológicas, tendo em vista a variedade de métodos de obtenção, com possibilidades de preparar materiais com diferentes formas, composições e propriedades. Nesta tese, foram sintetizados polímeros acrílicos em escala macro (polimerização em massa) e nano (polimerização em miniemulsão), puros ou em interação com moléculas fluorescentes e/ou nanopartículas magnéticas. A técnica de polimerização empregada neste trabalho foi a polimerização por adição via radicais livres, que será explicada em detalhes na presente seção. Além do mecanismo de polimerização, nesta seção serão abordadas as metodologias de polimerização que podem ser empregadas, dependendo da aplicação que se deseja, levando em consideração a dimensão do macro ao nano.

#### 2.2.1.1 Polimerização em cadeia via radicais livres

A polimerização em cadeia consiste na formação de uma cadeia polimérica, usualmente a partir da reatividade da dupla ligação vinílica de um monômero e sua sucessiva reação com outras moléculas. É formado então um homopolímero, quando a reação ocorre entre moléculas de um mesmo monômero, ou um copolímero, quando a reação ocorre entre moléculas de monômeros diferentes (CANEVAROLO, 2006).

A reação de polimerização em cadeia acontece normalmente após uma etapa de iniciação, em que é gerado o centro ativo. A iniciação é seguida da propagação, em que a cadeia cresce com a transferência do centro ativo de molécula a molécula. Por fim, a reação de terminação provoca o desaparecimento do centro ativo. A polimerização em cadeia pode ocorrer via radicais livres, de forma iônica, por meio de catalisadores de coordenação, dentre outras (CANEVAROLO, 2006). A seguir são explicadas com mais detalhes as etapas fundamentais do mecanismo via radicais livres, que é o mecanismo que se aplica à metodologia empregada no presente trabalho.

i) Iniciação - A iniciação de uma polimerização em cadeia via radicais livres normalmente ocorre por meio do uso de iniciadores termicamente instáveis (I-I). Inicialmente, os iniciadores são decompostos termicamente, resultando na formação de dois centros ativos. Uma vez que a molécula é usualmente (mas nem sempre) simétrica, estes dois centros ativos são iguais. O radical ativo ( $I^*$ ) reage com a dupla ligação de um monômero ( $C=C$ ), transferindo o centro ativo à molécula vinílica e dando início à polimerização (CANEVAROLO, 2006).

ii) Propagação – Nessa etapa ocorre a transferência do centro ativo de molécula a molécula, com o crescimento da cadeia polimérica, a uma alta velocidade e usualmente mais baixa energia de ativação, quando comparada à etapa de iniciação (CANEVAROLO, 2006).

iii) Terminação – A interrupção do crescimento da cadeia ocorre por meio do desaparecimento do centro ativo, que pode ocorrer de diferentes maneiras, dependendo do tipo de monômero e das condições de polimerização. O mecanismo de terminação pode ocorrer por combinação, desproporcionamento, transferência de cadeia, dentre outros. A terminação por combinação ocorre quando as extremidades ativas de dois macro-radicaís em crescimento se encontram, formando uma ligação C-C e resultando em uma única cadeia morta com massa molar mais elevada (uma vez que envolve a soma das massas molares individuais de cada radical).

A terminação por desproporcionamento ocorre por transferência intermolecular de hidrogênio do carbono cauda do mero (unidade de repetição da cadeia polimérica) posicionado na ponta ativada de uma cadeia polimérica para o carbono cabeça do mero posicionado na ponta ativada de outra cadeia polimérica, gerando uma cadeia morta com insaturação do tipo vinila terminal, enquanto a outra cadeia é saturada pelo átomo de hidrogênio transferido. O mecanismo de transferência de cadeia ocorre durante o crescimento de uma cadeia polimérica, quando esta abstrai um átomo de hidrogênio ou outro átomo lábil qualquer (como um halogênio) de uma outra molécula, interrompendo o seu crescimento e transferindo o centro ativo para essa outra molécula, que continua capaz de reagir com moléculas de monômeros presentes no meio reacional e mantém viva a polimerização (CANEVAROLO, 2006). Nesse caso, embora o efeito sobre as taxas de reação seja usualmente pequeno, o efeito sobre a distribuição de massas molares do produto final pode ser muito significativo.

### **2.2.1.2 Polimerização do macro ao nano**

Os polímeros podem ser obtidos por diversos métodos de polimerização, a depender da aplicação desejada para o produto final. Em linhas gerais, esses processos podem ser classificados como homogêneos, quando ocorrem em apenas uma fase, ou heterogêneos, quando o produto é insolúvel no meio reacional ou a reação ocorre em mais de uma fase. Como processos de polimerização homogêneos, destacam-se as polimerizações em massa e em solução (obtenção de polímero *bulk*). Entre os processos de polimerização heterogêneos, destacam-se as polimerizações em suspensão, emulsão e miniemulsão (obtenção de polímeros particulados, com variação dos diâmetros característicos de muitas ordens de grandeza, na forma macro/micro/submicro/nano) (CANEVAROLO JR., 2006; ODIAN, 2004).

#### **I. Polimerização em massa**

Na polimerização em massa o iniciador é adicionado diretamente ao monômero e a reação é iniciada por meio de ativação do iniciador por aquecimento. A vantagem deste processo é a qualidade do produto final, em virtude de elevada pureza obtida. Em contrapartida, há grande dificuldade para controlar a temperatura do sistema, já que a reação de polimerização é muito exotérmica, o que pode levar à instabilidade do processo. Além disso, as altas viscosidades atingidas podem comprometer a operação e a purificação do produto final (CANEVAROLO JR., 2006).

#### **II. Polimerização em solução**

A polimerização em solução é similar à polimerização em massa, mas ocorre na presença de um solvente. A adição do solvente no meio reacional garante melhor controle sobre as condições térmicas do sistema, permitindo melhor homogeneização da temperatura reacional por meio de uma transferência de calor mais efetiva. A reação é iniciada com total miscibilidade entre os componentes (monômero, iniciador e solvente). A introdução do solvente resulta na perda de produtividade do processo e em maiores custos para purificação e recirculação do solvente (CANEVAROLO JR., 2006).

#### **III. Polimerização em suspensão**

O processo usual de polimerização em suspensão consiste, inicialmente, na dispersão de uma carga orgânica (contendo um ou mais monômeros orgânicos e pelo menos um iniciador de radical livre) em uma fase aquosa contínua através da combinação

de agitação vigorosa e adição de estabilizantes (agentes de suspensão). Em seguida, as gotículas orgânicas dispersas gradualmente se transformam em esferas sólidas de polímero. O aumento da temperatura do meio garante a polimerização em cada gota e o controle de temperatura do sistema é facilitado pela presença da fase contínua, que dispersa o calor liberado pela polimerização. Por fim, são obtidas partículas com granulometria característica na faixa entre 10 µm e 1 mm. Ao contrário de outras técnicas de encapsulamento, a polimerização em suspensão permite o encapsulamento *in situ* de fármacos em uma única etapa, uma vez que os componentes bioativos podem ser incorporados diretamente na carga orgânica dispersa original, sendo possível aumentar as quantidades de compostos bioativos encapsulados nos sistemas poliméricos produzidos (PAIVA *et al.*, 2019; PINTO *et al.*, 2013).

#### **IV. Polimerização em emulsão**

Na polimerização em emulsão, assim como na polimerização em suspensão, o monômero é disperso em uma fase contínua. Em contrapartida, neste caso o iniciador está usualmente presente na fase contínua, ao invés de solubilizado no monômero. Na polimerização em emulsão clássica, a água compõe a fase contínua, que contém um agente emulsificante que promove a formação de micelas. A agitação do sistema leva à formação de gotas de monômero, mas a polimerização nas gotas é evitada, uma vez que o iniciador está presente na fase contínua. A polimerização ocorre no interior das micelas (parte hidrofóbica) com o monômero que migra das gotas. O produto final da reação é constituído por partículas com diâmetros característicos na faixa entre 50 nm e 1 µm (CANEVAROLO JR., 2006).

#### **V. Polimerização por miniemulsão**

O processo de miniemulsão consiste na criação de pequenas gotas estabilizadas em uma fase contínua, quando duas fases imiscíveis são submetidas à aplicação de alta tensão de cisalhamento. Idealmente, não se observam mudanças de tamanho entre a gota de monômero inicialmente estabilizada e a partícula de polímero obtida ao final da reação (LANDFESTER, 2009; LANDFESTER *et al.*, 2010). No processo de miniemulsão, cada gota pode ser vista como um nano-reator, porque cada uma apresenta comportamento independente, não sendo perturbada pelos outros eventos. Na etapa de pré-emulsão, a agitação cria pequenas gotas ao dispersar uma fase em uma fase contínua não miscível. Sob alta tensão de cisalhamento (como a ação de ultrassom, ultraturrax ou

homogeneizador de alta pressão), forma-se uma emulsão que apresenta gotas com estreita distribuição de tamanhos, com dimensão entre 50 e 500 nm. O tamanho das gotas depende, além do sistema de agitação mecânica, da quantidade e tipo de emulsificante utilizado e da presença de um agente estabilizante de pressão osmótica. O estabilizante deve apresentar boa solubilidade na fase dispersa e baixa solubilidade na fase contínua. Na etapa final, ocorre a reação de polimerização na fase dispersa, resultando na formação de nanopartículas poliméricas estabilizadas na fase contínua. O produto final da polimerização por miniemulsão é denominado látex (LANDFESTER *et al.*, 2010).

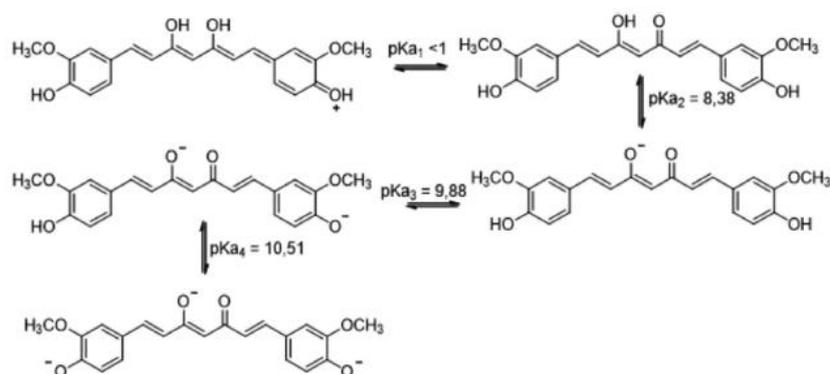
## **2.2.2 Fluorescência: conceitos e propriedades de materiais**

Visando agregar a característica de fluorescência ao nanossistema desenvolvido nesta tese, foi empregada a curcumina (na forma de extrato proveniente da cúrcuma). Portanto, faz-se necessário entender algumas particularidades deste fluoróforo, bem como compreender princípios fotoquímicos relacionados com o fenômeno de fluorescência. Estes pontos serão abordados nesta seção.

### **2.2.2.1 Propriedades fotofísicas da curcumina**

A ampla conjugação eletrônica presente na estrutura da curcumina, 1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)hepta-1,6-dieno-3,5-diona, confere a essa molécula propriedades ópticas que despertam interesse na área biomédica, considerando seu potencial como marcador fluorescente, uma opção promissora para avanços em técnicas de imagem e diagnóstico. Essas propriedades incluem absorção na região azul ( $\lambda_{\text{abs}} (\text{EtOH}) = 420 \text{ nm}$ ) e emissão na região verde do espectro eletromagnético ( $\lambda_{\text{em}} (\text{EtOH}) = 550 \text{ nm}$ ), com rendimento quântico de fluorescência  $\Phi_{\text{flu}} (\text{ACN}) = 0,10$  e rendimento quântico de oxigênio singlete  $\Phi_{\Delta} (\text{ACN}) = 0,11$  (CHIGNELL *et al.*, 1994). Sabe-se que a curcumina sofre efeito solvatocrômico, que ao modificar a polaridade do solvente, ocorre uma alteração no comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) da molécula. Além da polaridade do solvente, o pH também afeta o  $\lambda_{\text{máx}}$  de absorção da curcumina, já que a molécula pode coexistir em solução como cinco espécies diferentes (Figura 4), variando o grau de protonação ou desprotonação de acordo com o pH do meio no qual se encontra (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

**Figura 4.** Reações de transferência de prótons na curcumina.



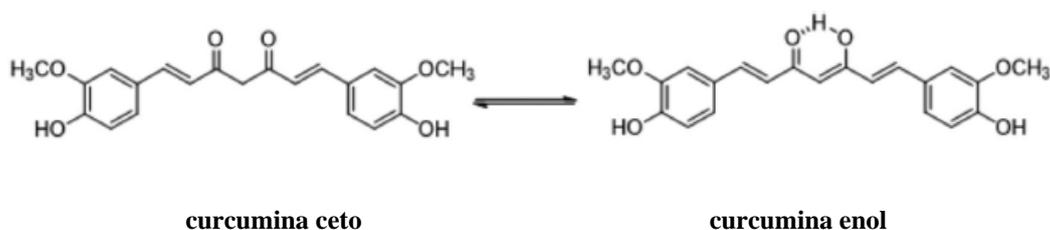
Fonte: Adaptado de SUETH-SANTIAGO *et al.* (2015).

Apesar da baixa solubilidade em água, a curcumina é solúvel em soluções aquosas alcalinas. Nestes casos, a solução apresenta coloração avermelhada, devido ao efeito batocrômico<sup>3</sup> ocasionado pela retirada de prótons da estrutura molecular, aumentando assim a densidade de elétrons na curcumina. A base conjugada da curcumina deve então funcionar como antioxidante doador de elétrons, haja visto que o enolato formado após a retirada do primeiro próton da curcumina gera uma espécie carregada negativamente. Entretanto, nesta faixa de pH a curcumina pode ser facilmente degradada (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

Em faixas de pH entre 3 e 7 existe um equilíbrio ceto-enólico da curcumina (Figura 5), deslocado preferencialmente para o sentido do enol, em razão da presença de uma ligação de hidrogênio intramolecular e de uma maior planaridade da molécula, o que favorece a conjugação na cadeia carbônica. Entretanto, a curcumina na forma ceto (mesmo em baixa concentração, quando comparada à forma enol) apresenta um grupo metileno deficiente de elétrons em função da vizinhança eletrofílica, o que a torna um ótimo doador de hidrogênio (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

<sup>3</sup>Deslocamento batocrômico é uma alteração da posição da banda espectral no espectro de absorção, reflectância, transmitância ou emissão de uma molécula para um comprimento de onda maior (menor frequência). Como a cor vermelha no espectro visível tem um comprimento de onda maior que a maioria das outras cores, o efeito também é comumente chamado de *red shift* (KAMLET; TAFT, 1976).

**Figura 5.** Equilíbrio tautomérico da curcumina.



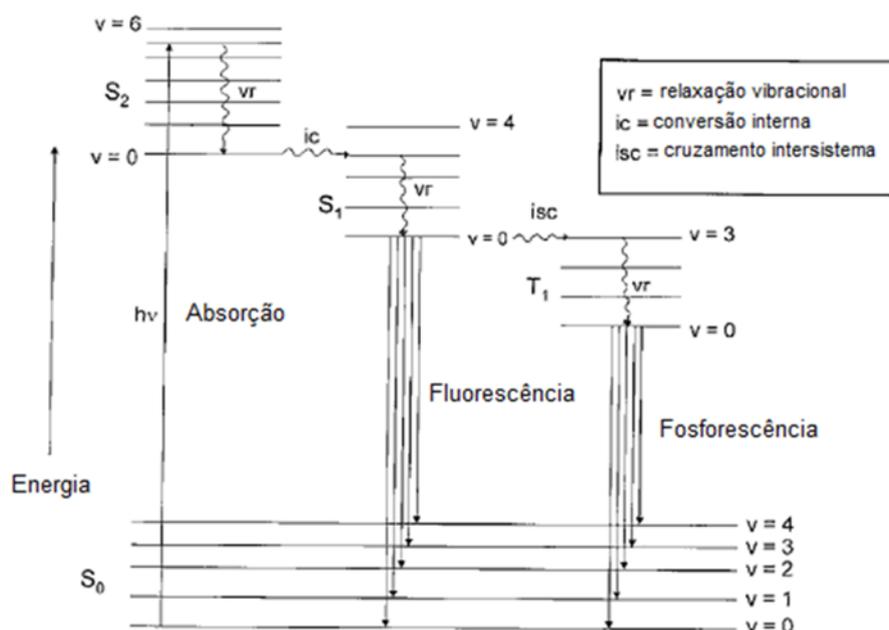
Fonte: Adaptado de SUETH-SANTIAGO *et al.* (2015).

### 2.2.2.2 *Conceitos fundamentais de fluorescência*

Os processos fotofísicos de um fluoróforo são usualmente iniciados pela absorção de um fóton de radiação visível ou ultravioleta, que leva à formação de um estado eletronicamente excitado, dotados de excesso de energia, que são de curta duração, liberando o excesso de energia em um período muito curto (escala de nanossegundos), por meio de uma variedade de processos de desativação e retornando a uma configuração do estado fundamental. Se a molécula excitada retorna ao seu estado fundamental original, então o processo dissipativo é um processo físico; no entanto, se uma nova espécie molecular for formada, o processo dissipativo é acompanhado por uma mudança química (WARDLE, 1989).

Os processos de relaxamento físico relacionados às moléculas orgânicas podem ser classificados genericamente como intramoleculares ou intermoleculares. Os processos intramoleculares compreendem transições radiativas (como fluorescência e fosforescência), que envolvem a emissão de radiação eletromagnética, à medida que a molécula excitada relaxa para o estado fundamental, e transições sem radiação, em que nenhuma emissão de radiação eletromagnética acompanha o processo de desativação. Já os processos intermoleculares contemplam processos de relaxamento vibracional, transferência de energia e transferência de elétrons (WARDLE, 1989). Os processos de relaxação dos estados excitados estão representados de forma sumária na Figura 6.

**Figura 6.** Diagrama Jablonski para uma molécula orgânica.

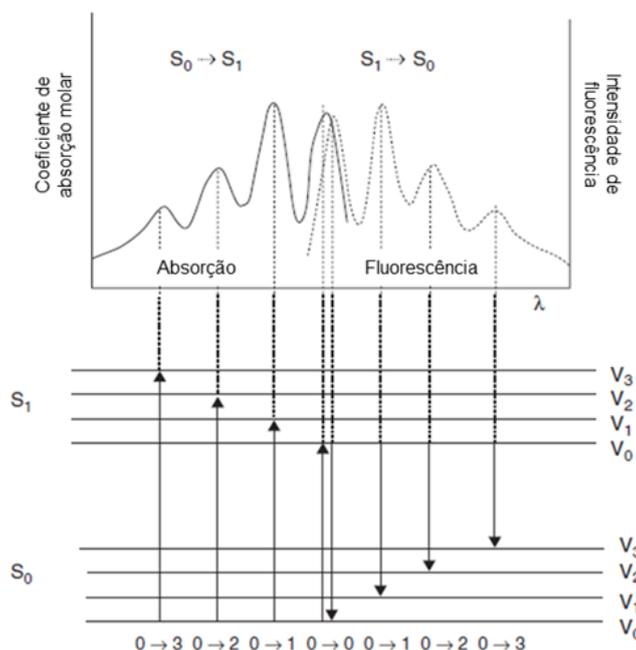


Fonte: Adaptado de WARDLE (1989).

A Figura 7 apresenta um exemplo de um espectro de absorção e emissão de fluorescência. Vale destacar alguns pontos importantes na análise deste espectro: (i) as bandas de transição 0-0<sup>4</sup> (S<sub>0</sub> → S<sub>1</sub>) para absorção e fluorescência ocorrem praticamente no mesmo comprimento de onda; (ii) a emissão de fluorescência ocorre em comprimentos de onda maiores (menor energia) do que a banda 0-0, enquanto a absorção ocorre em comprimentos de onda menores (energia mais alta) do que a banda 0-0; (iii) a absorção ocorre a partir do estado eletrônico fundamental e, devido ao rápido relaxamento vibracional, a fluorescência ocorre a partir do estado eletrônico excitado (WARDLE, 1989).

<sup>4</sup>Transição eletrônica 0-0 (0-0 bands) se refere à transição do estado eletrônico fundamental (S<sub>0</sub>) para o nível vibracional do estado eletrônico excitado (S<sub>1</sub>).

**Figura 7.** Espectro de absorção (linha contínua) e espectro de fluorescência (linha tracejada) do antraceno em benzeno.



Fonte: Adaptado de WARDLE (1989).

### 2.2.3 Magnetismo: conceitos e propriedades de materiais

Visando agregar a característica de magnetismo ao nanossistema desenvolvido nesta tese, foram empregadas nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. Portanto, é necessário entender algumas particularidades de magnetismo e nanomagnetismo, que serão abordados nesta seção. Complementarmente, dada a motivação de uso para o teranóstico tumoral empregando nanopartículas magnéticas, serão abordados nesta seção princípios de diagnóstico por imagem e terapia por hipertermia magnética.

#### 2.2.3.1 Magnetismo do macro ao nano

O estado magnético de um material é determinado pelo ordenamento e comportamento coletivo dos seus momentos magnéticos (DIAS, 2014). Materiais diamagnéticos não apresentam momentos magnéticos na ausência de campo. No entanto, sob ação de um campo magnético, os momentos magnéticos se alinham no sentido oposto à aplicação do campo, resultando em uma força de repulsão. Em materiais paramagnéticos, os momentos magnéticos tendem a se alinhar na direção e no sentido do campo aplicado. Todavia, na ausência do campo, a energia térmica disponível no sistema

impede que os momentos magnéticos interajam fortemente entre si, resultando em uma orientação aleatória. Materiais ferromagnéticos apresentam momentos magnéticos permanentes, mesmo na ausência de campo aplicado. Quando o campo aplicado é removido, o material conserva grande parte da magnetização. Materiais ferrimagnéticos e antiferromagnéticos apresentam comportamento similar aos ferromagnéticos. Nestes casos, na ausência de campo magnético os momentos magnéticos se acoplam de maneira antiparalela, resultando em uma magnetização global parcialmente reduzida ou nula. Isto se deve ao fato de os materiais apresentarem, respectivamente, momentos magnéticos desiguais ou idênticos (KOLHATKAR *et al.*, 2013).

Considerando o momento magnético e sua interação dipolar como a quantidade magnética elementar, a magnetização pode ser interpretada como a manifestação macroscópica da média volumétrica de um conjunto de momentos magnéticos. Partindo destes princípios, o conceito de domínio magnético descreve a existência de regiões dentro do material em que os momentos magnéticos se alinham e formam uma magnetização espontânea (DIAS, 2014). Os domínios magnéticos podem estar distribuídos de forma aleatória, de maneira que a resultante do campo magnético em qualquer direção é igual a zero e o material não apresenta magnetização. Quando o material sofre ação de um campo magnético externo, os domínios magnéticos tendem a se organizar, orientando-se na direção do campo aplicado, até atingir a saturação máxima. A remoção do campo externo reduz o grau de alinhamento dos domínios, não necessariamente retomando a condição inicial de desordem, reflexo da possível existência de histerese magnética no material (FILHO, 2014).

A variação da magnetização ( $M$ ) como função do campo aplicado ( $H$ ) constitui uma importante ferramenta para o estudo de materiais magnéticos. A relação entre estas grandezas costuma ser apresentada como um ciclo de histerese, em que são identificadas importantes grandezas relacionadas ao conceito de domínios magnéticos apresentado anteriormente. A magnetização de saturação ( $M_s$ ) é a magnetização da amostra quando todos os domínios estão alinhados; a magnetização remanescente ( $M_r$ ) é a magnetização do material a campo zero; e o campo coercivo ( $H_c$ ) é o campo necessário para anular a magnetização remanescente (DIAS, 2014). Vale ressaltar que a presença de histerese na curva de magnetização é característica de materiais ferromagnéticos e ferrimagnéticos, uma vez que estes conservam parte da magnetização, mesmo após a remoção do campo magnético aplicado.

Quando o material (ferrimagnético ou ferromagnético) apresenta dimensão diminuta, a região do domínio magnético também é reduzida até um valor crítico em que um monodomínio é formado. Neste caso, a partícula permanece espontaneamente magnetizada em uma só direção e apresenta estado de superparamagnetismo, salvo a influência da temperatura (ESTELRICH *et al.*, 2015). Em estado superparamagnético, negligenciando o efeito de anisotropia de forma, a curva de magnetização em função do campo magnético apresenta campo coercivo e magnetização remanescente nulos; ou seja, não apresenta histerese magnética. Esta característica apresenta grande vantagem em aplicações biomédicas, uma vez que as partículas perdem a magnetização quando o campo magnético é removido. Assim, é eliminada a principal força motriz responsável pelo efeito de agregação, indesejável para este tipo de aplicação. Além disso, nanopartículas superparamagnéticas são desejáveis para aplicações biomédicas em virtude do efetivo controle de suas propriedades magnéticas, uma vez que apresentam forte resposta à aplicação de campo magnético externo (KOLHATKAR *et al.*, 2013).

### ***2.2.3.2 Diagnóstico por imagem (RMN e TC)***

Nanopartículas magnéticas promovem bons contrastes de imagem para diagnóstico por ressonância magnética nuclear (RMN) e tomografia computadorizada (TC), dadas suas propriedades magnéticas e estrutura cristalina, respectivamente. Nesta seção serão detalhados os princípios de imageamento pelas referidas técnicas.

#### **I. Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

A técnica de espectroscopia por ressonância magnética nuclear (RMN) permite a obtenção de imagens de tecidos com boa resolução. Os princípios desta técnica foram estabelecidos por Félix Bloch e Edward Mills Purcell, ao estudar o comportamento de núcleos atômicos colocados em um campo magnético. Por tais pesquisas, esses pesquisadores receberam, em 1952, o prêmio Nobel de Física (BLOCH; PURCELL, 1952). Atualmente, essa técnica é amplamente empregada na Física e na Química, para o estudo da dinâmica dos átomos e elucidação de estruturas moleculares. Na Medicina, no entanto, o potencial das técnicas de RMN só começou a delinear-se no início da década de 1970, quando se observou que havia diferenças sistemáticas nas propriedades de relaxação nuclear dos tecidos normais, necrosados e tumorais. Tais diferenças podem ser apreciadas claramente nas imagens processadas pela técnica de RMN (LAUTERBUR, 1973).

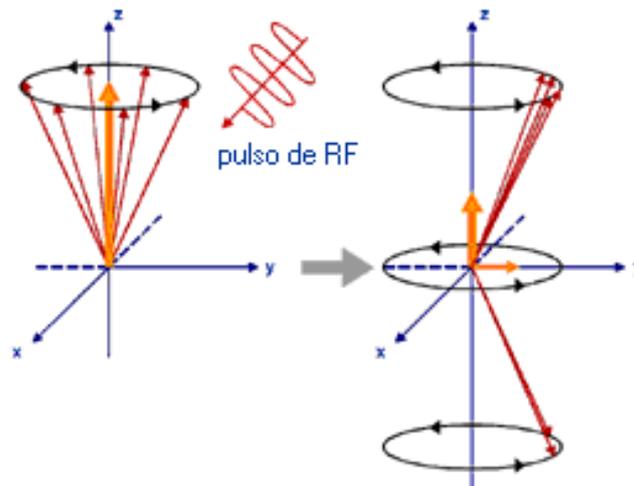
Para realizar o imageamento de um organismo, o paciente fica posicionado dentro de um *scanner* de RMN, que forma um forte campo magnético em torno da área a ser imageada, de maneira que o paciente passa a se comportar como um campo magnético próprio, que responde à atuação do campo magnético externo. Neste campo magnético próprio, os *spins* dos prótons são somados vetorialmente. Como essa magnetização é direcionada ao longo do campo magnético externo, é denominada de magnetização longitudinal. No entanto, a força magnética paralela ao campo magnético externo não pode ser medida. Somente uma magnetização perpendicular à direção do campo magnético pode ser medida, mediante a excitação dos prótons; isto é, fornecendo energia ao movimento precessional (de mudança de eixo rotacional) dos prótons, a fim de que procedam à mudança da direção da magnetização gerada (LAUTERBUR, 1973).

No paciente submetido a um campo magnético externo, é emitida uma onda de radiofrequência (RF) sintonizada; mais exatamente, uma onda intensa de curta duração (um pulso de radiofrequência). O objetivo dessa ação é conseguir perturbar aqueles prótons que se encontram precessando em direção ao campo magnético externo. Quando a frequência de precessão dos prótons entra em ressonância com o pulso de radiofrequência, ocorrem dois efeitos: a magnetização longitudinal (T1) e a magnetização transversal (T2). Tudo isto resulta, como pode ser visto na Figura 8, em uma redução do vetor da magnetização longitudinal (no plano z, paralelo ao vetor externo de campo magnético) e no crescimento de uma nova magnetização transversal (no plano x,y). Em resumo, o pulso de radiofrequência provoca um decréscimo na magnetização longitudinal e estabelece uma magnetização transversal que se movimenta com a mesma frequência de precessão dos prótons (MCROBBIE *et al.*, 2007).

Uma vez que o pulso de radiofrequência é desligado, o sistema total que foi perturbado retorna ao seu estado original de equilíbrio. A nova magnetização transversal estabelecida começa a desaparecer (o processo é chamado de relaxação transversal), enquanto a magnetização longitudinal cresce até recuperar a configuração original (este último processo é chamado de relaxação longitudinal). Tal comportamento está ilustrado nas curvas de relaxação apresentadas na Figura 9. O tempo necessário para que a magnetização longitudinal recupere o estado inicial é descrito pelo tempo de relaxação longitudinal, ou tempo de relaxação *spin-rede*, chamado de T1. Já a constante de tempo que descreve a velocidade com que a magnetização transversal diminui é chamada de tempo de relaxação transversal, ou tempo de relaxação *spin-spin*, representado por T2.

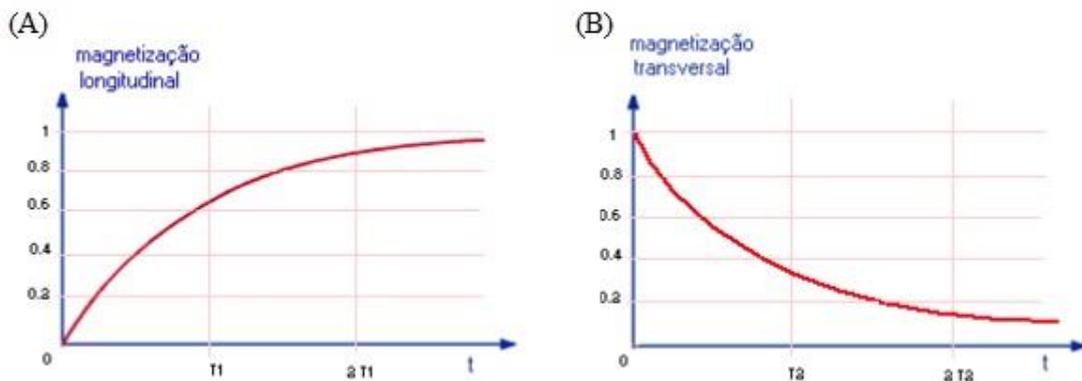
Sabe-se que  $T_1$  é aproximadamente entre 2-10 vezes maior que  $T_2$  (MCROBBIE *et al.*, 2007).

**Figura 8.** Pulso de radiofrequência emitido sob um próton alinhado a um campo magnético externo que sofre efeito de magnetização longitudinal ( $T_1$ ) e magnetização transversal ( $T_2$ ).



Fonte: Adaptado de MCROBBIE *et al.* (2007).

**Figura 9.** Curvas de relaxação longitudinal (A) e transversal (B), obtidas após remoção do pulso de radiofrequência.



Fonte: Adaptado de MCROBBIE *et al.* (2007).

Em resumo, na maioria das aplicações médicas átomos de hidrogênio em tecidos que contêm moléculas de água criam um sinal que é processado para formar uma imagem. Primeiro, a energia de um campo magnético oscilante é aplicada temporariamente no paciente na frequência de ressonância apropriada. Os átomos de hidrogênio excitados

emitem um sinal de radiofrequência, que é medido por uma bobina receptora. O sinal de rádio pode ser feito para codificar informações de posição, variando o campo magnético principal, usando bobinas de gradiente. O contraste entre diferentes tecidos é determinado pela taxa com que os átomos excitados retornam ao estado de equilíbrio. Cada tecido retorna ao seu estado de equilíbrio após a excitação pelos processos independentes de relaxação longitudinal (T1) e transversal (T2). Agentes de contraste exógenos podem ser administrados por via intravenosa, oral ou intra-articular para intensificar a resposta e melhorar a qualidade da imagem (MCROBBIE *et al.*, 2007).

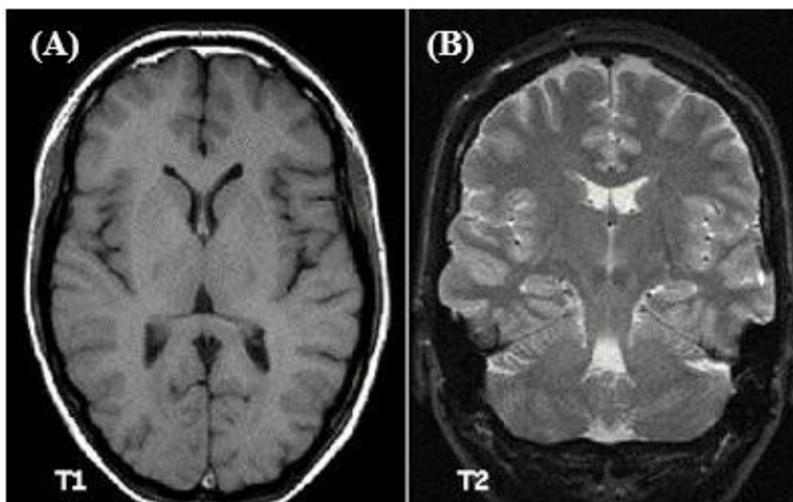
Os tempos de relaxação longitudinal (T1) e transversal (T2) dependem da composição e estrutura do tecido alvo e de sua proximidade com outros tecidos. O tempo de relaxação tem relação com a transferência de energia térmica dos prótons excitados com o meio em que se encontram. Se o meio é um líquido puro, ou simplesmente água, a transferência de energia é dificultada pela alta velocidade de movimentação das pequenas moléculas de água. Os prótons requerem um tempo maior para conseguir transferir a energia para o meio e retornar ao estado de equilíbrio. A magnetização longitudinal requer, então, um tempo mais longo para recuperar o valor inicial e isto significa que líquidos puros e água apresentam tempos de relaxação longitudinal T1 longos. O tempo de relaxação T1 é mais curto quando se trata de tecidos corpóreos formados por líquidos que contêm moléculas de diversos tamanhos. Nestes meios, a energia térmica pode ser transferida mais rapidamente, já que as moléculas se movimentam e possuem campos magnéticos com frequências próximas à frequência dos prótons excitados. Esta condição ressonante é indispensável para a transferência de energia. Já a relaxação transversal é produto da heterogeneidade presente nos campos magnéticos externo e interno (MCROBBIE *et al.*, 2007).

Como foi mencionado anteriormente, as moléculas de água se movimentam rapidamente em meios líquidos e, assim, seus campos magnéticos mudam também rapidamente, não deixando estabelecer grandes diferenças entre os campos magnéticos em diferentes pontos. Não havendo grandes diferenças nas intensidades do campo magnético no meio, os prótons ficam precessando durante um tempo maior, em fase, o que faz com que o tempo de relaxação transversal T2 seja também maior. Nos líquidos que apresentam impurezas e grandes moléculas, existe uma grande variação na intensidade dos campos magnéticos locais. As grandes moléculas se movimentam mais lentamente, de forma que seus campos magnéticos não se eliminam tanto. A grande

diferença dos campos magnéticos locais gera, por sua vez, grandes diferenças nas frequências de precessão e, desta maneira, mais prótons deixam de apresentar coerência de fase. Neste caso, o tempo de relaxação transversal T2 tende a ser menor (MCROBBIE *et al.*, 2007).

Todos os processos descritos anteriormente influenciam a qualidade final da imagem gerada no equipamento de RMN. A Figura 10 ilustra imagens obtidas em um corte encefálico. Se na imagem obtida o líquido encéfalo-raquideano estiver mais escuro do que as partes sólidas, é obtida uma imagem mediada pelo parâmetro T1 (Figura 10-A). Se o fluido estiver representado em uma cor branca, é obtida uma imagem mediada pelo parâmetro T2 (Figura 10-B). O sinal proveniente da substância cinzenta é maior que o proveniente da substância branca pelo fato de que a massa cinzenta possui maior quantidade de água e, por consequência, um número maior de prótons (MCROBBIE *et al.*, 2007).

**Figura 10.** Imagem de Ressonância Magnética Nuclear gerada por medição do parâmetro T1 (A) e do parâmetro T2 (B).



Fonte: Adaptado de MCROBBIE *et al.* (2007).

A ressonância magnética para imagens de estruturas anatômicas ou fluxo sanguíneo não requer a adição de agentes de contraste, pois as propriedades variáveis dos tecidos ou sangue proporcionam contrastes naturais. No entanto, para salientar tecidos com características similares são usados meios de contraste. Os agentes de contraste intravenosos mais utilizados são baseados em quelatos de gadolínio. Essas substâncias

apresentam propriedades paramagnéticas que diminuem os tempos de relaxação nas vizinhanças dos prótons (RINCK, 2019).

Em geral, o uso desses agentes se mostra mais seguro do que o uso de agentes de contraste iodados utilizados em radiografia ou tomografia computadorizada; no entanto, ainda representam riscos a pacientes que sofrem de insuficiência renal grave (MURPHY; BRUNBERG; COHAN, 1996). Neste contexto, as nanopartículas inorgânicas superparamagnéticas figuram como interessantes agentes exógenos de contraste magnético, garantindo maior segurança e melhor qualidade de imageamento (LIU; FAN, 2014).

## **II. Tomografia computadorizada (TC) e microtomografia (microCT)**

A descoberta dos raios X em 1895 pelo físico alemão Wilhelm Conrad Röntgen impulsionou o avanço da Física e o desenvolvimento de aplicações técnicas na área da radiação, radiologia e tomografia computadorizada (TC). Em 1916, o pesquisador polonês Karol Mayer desenvolveu uma técnica precursora da tomografia clássica, permitindo imagens radiográficas sem sobreposições cardíacas (CIERNIAK, 2011). Considerado o pai da tomografia, o físico francês André Bocage em 1922 descreveu o funcionamento de um equipamento que movia o emissor de raios X e o filme radiográfico simultaneamente (THOMAS, 2022). No entanto, foi a união do computador com os raios X uma das inovações mais importantes da segunda metade do século XX, o que impulsionou o desenvolvimento dos exames tomográficos. Na década de 1970, pesquisadores criaram técnicas de reconstrução digital de imagens tomográficas, revolucionando o diagnóstico radiológico. Em 1979, Cormack e Hounsfield receberam o Nobel de Medicina pelo desenvolvimento da tomografia computadorizada (TC) (KRAMME; HOFFMANN; POZOS, 2011).

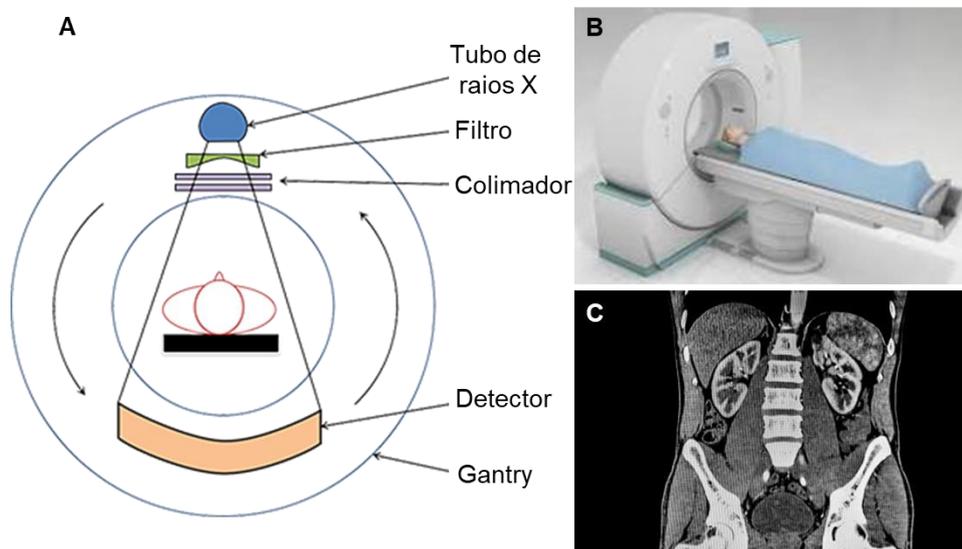
O desenvolvimento e a introdução clínica da TC revolucionaram a prática contemporânea da medicina. Ao longo das décadas, os equipamentos de TC têm passado por constante evolução, possibilitando a compreensão e representação aprimoradas de doenças, incluindo a medição da morfologia/estágio tumoral, reconhecimento de padrões patognomônicos de doenças em determinados órgãos, além do diagnóstico precoce de processos patológicos e o perfil fenotípico mais preciso (SAMEI; PELC, 2020). O sistema de TC, como pode ser observado na Figura 11, consiste em uma fonte de raios X, um

detector de raios X e uma poderosa unidade de processamento de dados para calcular, exibir e analisar os resultados das medições. Os principais componentes do tomógrafo são:

(i) *Gantry*: possui uma abertura central, para onde o paciente é movido durante o exame. Este é o elemento principal do *scanner* de TC, em que se encontram o tubo de raios X e o conjunto de detectores. Por intermédio do *Gantry* é possível controlar a tensão (kv) e corrente elétrica (mA) da ampola de raio X, além de permitir a interação dos comandos do painel de controle com o sistema e botões controladores da mesa do tomógrafo;

(ii) Mesa rotativa: pode ser movida para dentro ou para fora da *Gantry* ao longo do eixo do corpo do paciente, assim como para cima ou para baixo. Isso permite que o paciente seja posicionado adequadamente, dependendo da parte do corpo que está sendo examinada (CIERNIAK, 2011).

**Figura 11.** Representação ilustrativa de um sistema TC e seus componentes (A e B) e imagem abdominal obtida a partir de um escaneamento TC (C).



Fonte: Adaptado de *NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH* e *RADIOLOGYCAFE*.

Durante a tomografia computadorizada, o tubo e o detector do *scanner* giram 360° ao redor do paciente, emitindo radiação ionizante para aquisição das imagens. Diferentes estruturas anatômicas absorvem a radiação de maneira variável, de acordo com sua densidade. Os sinais capturados pelo detector são convertidos em imagens e transmitidos

para um computador. Tecidos densos, como o osso, absorvem mais radiação e aparecem mais claros nas imagens, enquanto tecidos menos densos, como gordura e órgãos internos, absorvem menos radiação e aparecem mais escuros (KRAMME; HOFFMANN; POZOS, 2011). A evolução dos *scanners* de TC tem sido marcada por mudanças no *design* dos subsistemas de projeção do sistema de aquisição de dados.

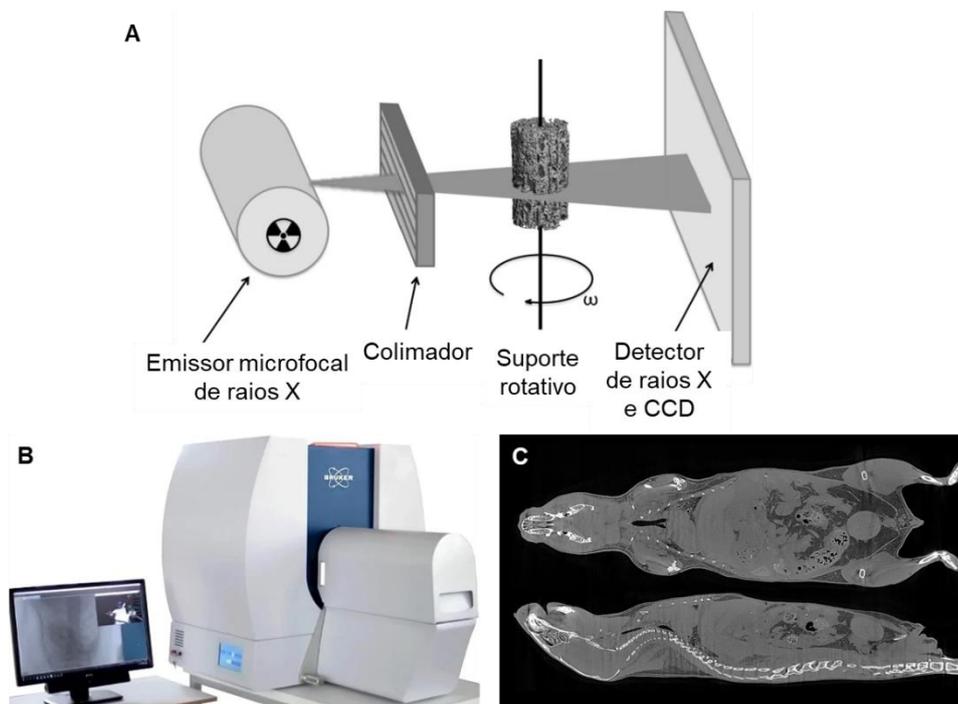
O *design* de cada geração de *scanners* de TC contém um dos três sistemas básicos de projeção tubo-detector: (i) um sistema de projeção utilizando um feixe paralelo de radiação (sistema de feixe paralelo); (ii) um sistema utilizando um feixe de radiação em forma de leque (sistema de feixe em leque) e (iii) um sistema utilizando um feixe de radiação em forma de cone (sistema de feixe cônico) (SAMEI; PELC, 2020). Inicialmente, a TC era aplicada principalmente na área médica em imagiologia diagnóstica. No entanto, no final da década de 1970, sua utilização se expandiu para o campo industrial e a necessidade de obter imagens de alta resolução em escalas micrométricas levou ao desenvolvimento de tomógrafos capazes de construir imagens tridimensionais em proporções microestruturais.

Em 1980, o físico Lee FeldKamp criou o primeiro microtomógrafo para avaliar defeitos em estruturas automotivas (BOERCKEL *et al.*, 2014). A microtomografia computadorizada (microCT) baseia-se nos mesmos princípios fundamentais da TC; no entanto, possui uma capacidade de resolução extremamente alta e mantém uma estabilidade adequada da energia máxima do tubo de raios X. A principal diferença dessa técnica reside no tamanho do foco do tubo de raios X, que varia de 100 a 0,1 micrômetros, o que viabiliza a obtenção de informações mais detalhadas e precisas (LI *et al.*, 2008). Atualmente, a microCT é uma técnica consolidada em pesquisas biomédicas envolvendo tecidos mineralizados, dentes, ossos e em estudos morfológicos de tecidos moles (utilizando contrastes), como fígado e pulmão, obtidos por meio de biópsias ou eutanásia de pequenos roedores (*ex vivo*). A avaliação de modelos experimentais *in vivo*, como pequenos roedores, requer a anestesia geral e contenção do animal em um suporte específico para esse tipo de escaneamento (CIERNIAK, 2011; BEAUCAGE *et al.*, 2016).

O equipamento de microCT é composto basicamente por um emissor microfocal de raios X, um colimador, um suporte para a amostra e um detector de raios X, constituído por um detector de cintilação e um dispositivo de carga acoplada (CCD) (BOERCKEL *et al.*, 2014), como pode ser observado na Figura 12. Em uma análise usual, os raios X são

produzidos pelo emissor microfocal de radiação, direcionados através de colimação e incidem sobre a amostra, em que ocorre a atenuação dos raios X (isso varia de acordo com as propriedades de cada material presente na amostra). A radiação não atenuada atravessa a amostra e chega ao detector de cintilação, onde é convertida em fótons de luz visível capturados pelo CCD, gerando um sinal eletrônico digitalizado que é enviado ao computador para processamento. Cada *pixel* na imagem final corresponde à média de absorção de fótons pelo detector de cintilação; durante a reconstrução tridimensional, cada *pixel* se torna um *voxel* representando a profundidade na imagem microtomográfica (CLARK; BADEA, 2014; LI, H. *et al.*, 2008).

**Figura 12.** Representação ilustrativa de um sistema microCT e seus componentes (A e B) e imagens de cortes transversais através do corpo de um camundongo a partir de um escaneamento microCT (C).



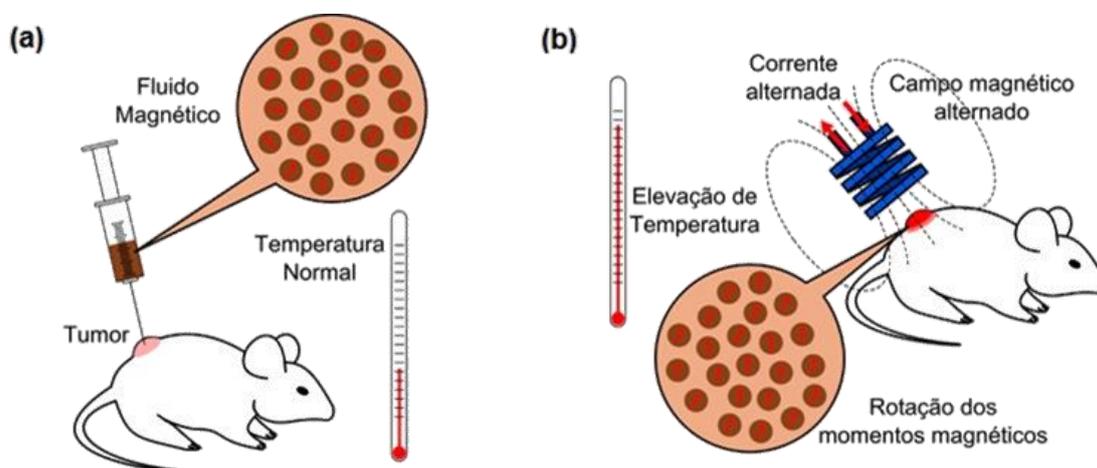
Fonte: BRUKER e adaptado de BOERCKEL *et al.* (2014).

### 2.2.3.3 Tratamento por hipertermia magnética

Nanopartículas magnéticas são materiais versáteis para aplicações biomédicas, devido a suas propriedades magnéticas peculiares. O regime superparamagnético destas partículas impõe uma dinâmica magnética bastante lenta, que permite a recuperação da remanência do material de forma bem controlada, quando aplicado um campo magnético

alternado de alta frequência. Nesta situação, as nanopartículas magnéticas liberam energia, promovendo um aumento de temperatura localizado. Este efeito é promissor para o tratamento de tumores e é conhecido como hipertermia magnética (esquemático na Figura 13). O tratamento é baseado no aquecimento localizado do tecido tumoral na faixa de 41 a 45 °C, estimulado por um campo magnético alternado externo. Nessa faixa de temperatura, o dano é reversível em células saudáveis, mas não em células tumorais (BROLLO *et al.*, 2016).

**Figura 13.** Representação esquemática do tratamento de câncer por hipertermia magnética, empregando nanopartículas magnéticas: (a) introdução do fluido magnético no tecido tumoral e (b) aplicação de campo magnético alternado para induzir o aquecimento.



Fonte: Adaptado de MCROBBIE *et al.* (2007).

A dinâmica de resposta da partícula durante a transformação da energia magnética em calor, empregando um campo magnético alternado, é governada sobretudo por flutuações térmicas que ocorrem na partícula. O mecanismo de geração de calor por partículas magnéticas pode ser atribuído a perdas por histerese ou relaxação (de Néel ou Brown). No caso de partículas superparamagnéticas, que não apresentam histerese na curva de magnetização, o mecanismo ocorre por relaxação. A liberação de calor por relaxação de Néel está relacionada à rápida mudança de direção dos momentos magnéticos referente à estrutura cristalina do material, enquanto a liberação de calor por relaxação de Brown está relacionada ao atrito gerado pela rotação física das partículas no meio em que se encontram. Ou seja, um mecanismo se refere à dinâmica interna da

partícula, enquanto o outro mecanismo se refere à dinâmica externa (KUMAR; MOHAMMAD, 2011).

A eficiência do material para gerar calor por indução de campo magnético alternado é medida em termos de perda específica de potência (SLP - *specific loss power*), também conhecida pela notação de taxa de absorção específica (SAR - *specific absorption rate*). Essa grandeza pode ser definida como a potência gerada pela nanopartícula, normalizada pela massa de nanopartícula. Em outras palavras, é a medida direta da taxa de aquecimento que a nanopartícula é capaz de fornecer (DIAS, 2014).

Para fins clínicos, são desejadas nanopartículas que resultem em elevados valores de SLP, possibilitando a administração de menores quantidades de material para uma mesma condição terapêutica, minimizando possíveis efeitos colaterais relacionados ao excesso de nanopartículas no organismo do paciente. Geralmente, o valor de SLP é dependente de parâmetros como estrutura da partícula (tamanho, forma e arranjo cristalino), propriedades magnéticas da partícula (anisotropia magnética e temperatura de magnetização) e condições do campo magnético alternado (amplitude e frequência) (KUMAR; MOHAMMAD, 2011). Muitos destes parâmetros podem ser controlados, seja na síntese da partícula magnética ou no momento de aplicação do campo magnético. Aliando o anseio por elevadas taxas de aquecimento com a necessidade de evitar prejuízos à saúde do paciente, a escolha dos parâmetros de campo magnético alternado para hipertermia pode ser otimizada, se o produto entre a amplitude e frequência não exceder  $5 \times 10^9 \text{ A m}^{-1} \text{ s}^{-1}$  (HERGT; DUTZ, 2007).

Esforços recentes têm sido feitos para comprovar que a técnica de hipertermia magnética intracelular constitui um método terapêutico viável, controlável e não invasivo e que, portanto, pode ser consolidado como tratamento para condições patológicas humanas (BLANCO-ANDUJAR *et al.*, 2016). As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro já são aprovadas para testes em humanos e existe um protótipo dedicado a testes clínicos de tratamento de câncer por hipertermia magnética, localizado em Berlin (JORDAN *et al.*, 2001). A *MagForce Nanotechnologies AG* é a única empresa que utiliza nanopartículas de óxido de ferro para tratamento de tumores por hipertermia magnética em humanos, apresentando ensaios clínicos em estágio avançado. O primeiro teste clínico foi apresentado por JOHANNSEN *et al.* (2005), abordando o tratamento de câncer de próstata de maneira promissora.

## 2.3 Revisão da Literatura

A presente seção encontra-se subdividida em três grandes áreas: (i) polímeros fluorescentes e curcuminoides; (ii) nanopartículas fluorescentes e magnéticas; e (iii) teranóstico com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro. A estratégia de revisão segmentada é necessária para avaliar na integridade as lacunas da literatura ao redor do tema da tese, dadas as múltiplas composições e aplicações que envolvem os nanossistemas desenvolvidos neste trabalho.

### 2.3.1 Polímeros fluorescentes e curcuminoides

A Tabela 1 reúne um conjunto de trabalhos recentes que apresentam estruturas poliméricas de diferentes naturezas contendo curcumina/curcuminoides em sua composição. Tais materiais podem ser obtidos por diferentes metodologias, resultando em estruturas com morfologias distintas. São também sugeridas diferentes aplicações para os materiais descritos.

MISHRA e DASWAL (2005) empregaram curcumina como fotoiniciador da copolimerização de estireno com metacrilato de metila, via polimerização por radicais livres. A polimerização ocorreu em fotorreator irradiado com luz UV (253 nm, lâmpadas de 8W a 10 cm da mistura reacional) e mantido a 30 °C por 7 h. Apesar da baixa conversão (inferior a 5,0 %), foi confirmada a formação do copolímero. Os autores propuseram um mecanismo de copolimerização envolvendo iniciação por hidrogênio radicalar proveniente da fotodegradação da curcumina.

BISHT *et al.* (2007) encapsularam nanocristais de curcumina em agregados poliméricos micelares de copolímeros compostos por N-isopropilacrilamida (NIPAAm) com N-vinil-2-pirrolidona (VP) e poli(etilenoglicol)monoacrilato (PEG-A). A copolimerização dos agregados micelares dos monômeros anfífilicos foi realizada pelo processo de polimerização via radicais livres. As nanopartículas poliméricas obtidas foram carregadas com a curcumina, por simples processo de dispersão de ambos em solvente, seguido por liofilização. A nanocurcumina mostrou eficácia terapêutica *in vitro* contra linhagem celular de câncer pancreático humano, confirmando o potencial antitumoral da biomolécula.

**Tabela 1.** Revisão da literatura de trabalhos envolvendo polímeros e curcumina.

<b>Título</b>	<b>Estrutura e composição</b>	<b>Referência</b>
<i>Improving antimicrobial activity against endodontic biofilm after exposure to blue light-activated novel curcumin nanoparticle</i>	Curcumina encapsulada em NPs poliméricas de PLGA	(MINHACO <i>et al.</i> , 2023)
<i>Amphiphilic polymeric nanoparticles encapsulating curcumin: Antioxidant, anti-inflammatory and biocompatibility studies</i>	NPs poliméricas carregadas com curcumina baseadas em um sistema terpolímero de natureza anfifílica	(PONTES-QUERO <i>et al.</i> , 2021)
<i>Nanosuspension-based dissolving microneedle arrays for intradermal delivery of curcumin</i>	Microagulhas de PVA carregadas com nanossuspensão de curcumina	(ABDELGHANY <i>et al.</i> , 2019)
<i>PMMA@SCNC composite microspheres prepared from pickering emulsion template as curcumin delivery carriers</i>	Microesferas de PMMA-curcumina recobertas por nanocristais de celulose	(LIU <i>et al.</i> , 2018)
<i>Curcumin as fluorescent probe for directly monitoring in vitro uptake of curcumin combined paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles</i>	Nanopartículas de PLA-TPGS co-carreadoras de curcumina e paclitaxel	(NGUYEN <i>et al.</i> , 2016)
<i>Electrospun polylactide-based materials for curcumin release: Photostability, antimicrobial activity, and anticoagulant effect</i>	Microfibras de PLA, PVP e PEG carregadas com curcumina	(YAKUB <i>et al.</i> , 2016)
<i>PNIPAAm-MAA nanoparticles as delivery vehicles for curcumin against MCF-7 breast cancer cells</i>	Nanopartículas de PNIPAAm-MAA carreadoras de curcumina	(ZEIGHAMIAN <i>et al.</i> , 2016)
<i>Encapsulation of Curcumin and Curcumin Derivative in Polymeric Nanospheres</i>	Nanoesferas de P(MMA-HEMA) contendo curcumina e derivado sintético	(SOBH <i>et al.</i> , 2015)
<i>Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin ("nanocurcumin"): a novel strategy for human cancer therapy</i>	Nanocristais de curcumina encapsulados em agregados poliméricos de NIPAAm, VP e PEG	(BISHT <i>et al.</i> , 2007)
<i>Curcumin, a novel natural photoinitiator for the copolymerization of styrene and methylmethacrylate</i>	Não se aplica (curcumina empregada como fotoiniciador da polimerização)	(MISHRA; DASWAL, 2005)

Moléculas de curcumina e derivado sintético do fluoróforo foram encapsuladas em nanoesferas de poli(metacrilato de metila (MMA)/2-hidroxietilmetacrilato (HEMA) por SOBH *et al.* (2015). Neste trabalho, a curcumina foi modificada estruturalmente, resultando em um derivado sintético solúvel em meio aquoso. A curcumina, assim como o derivado sintético, foi encapsulada no copolímero, empregando a metodologia de polimerização por microemulsão. A emulsão foi composta pelos monômeros (fase dispersa) em água (fase contínua). Os polímeros pré-formados polivinilpirrolidona (PVP) e polietilenoglicol (PEG) foram empregados, respectivamente, como emulsificante do sistema heterogêneo e estabilizante do curcuminoide. Ensaio de liberação *in vitro* apontaram os nanossistemas como promissores para aplicações terapêuticas, como tratamento de câncer.

ZEIGHAMIAN *et al.* (2016) examinaram o potencial citotóxico da curcumina encapsulada em nanopartícula de poli[(N-isopropilacrilamida)-CO-(ácido metacrílico)] (PNIPAAm-MAA), na linhagem celular de câncer de mama MCF-7. Neste trabalho, o copolímero foi sintetizado, via polimerização em solução, empregando 1,4-dioxina como solvente, peróxido de benzoíla como iniciador e bisacrilamida como agente reticulante. O copolímero obtido foi precipitado como nanopartículas, após verter a solução reacional em hexano. A incorporação de curcumina foi realizada por adição do ativo, solubilizado em clorofórmio, nas nanopartículas poliméricas pré-formadas, seguida de evaporação do solvente. A avaliação dos resultados mostrou que a curcumina exerce mais efeito citotóxico na linhagem de células MCF-7, quando em interação com as nanopartículas de NIPAAm-MAA.

YAKUB *et al.* (2016) prepararam microfibras de ácido polilático (PLA), PVP e PEG carregadas com curcumina, empregando o método de eletrofiação. Foi utilizado diclorometano para solubilizar os polímeros pré-formados e dimetil sulfóxido para solubilizar a curcumina. A incorporação de curcumina nas fibras contribuiu para proteger a curcumina de fotodegradação, além de incrementar a resistência térmica e mecânica das fibras. A exposição das fibras à radiação indicou que a matriz polimérica exerceu um efeito significativo na fotoestabilidade da curcumina. No caso dos polímeros que são capazes de formar ligações de hidrogênio com a curcumina, como PEG e PVP, a liberação da biomolécula foi facilitada pela formação de complexos hidrossolúveis. Complementarmente, a taxa de liberação de curcumina foi avaliada, validando o potencial uso médico do material, que apresentou atividade antibacteriana e anticoagulante.

Nanopartículas poliméricas contendo curcumina foram obtidas por NGUYEN *et al.* (2016), preparadas por emulsificação seguida de evaporação de solvente. Neste trabalho, a fase contínua foi composta por água, contendo o copolímero poli(lactídeo)-D- $\alpha$ -tocoferil-succinato de polietilenoglicol (PLA-TPGS) solubilizado, enquanto a fase orgânica foi composta por diclorometano, empregado como agente solubilizante da curcumina e do fármaco paclitaxel. O sistema composto por ambas as fases foi submetido a agitação durante 24 h. A emulsão obtida foi submetida a procedimento de evaporação de solvente, garantindo a obtenção de nanopartículas poliméricas contendo o fluoróforo e o fármaco antitumoral. A captação celular e as atividades fluorescentes da curcumina nesses sistemas também foram testadas por estudos de bioensaio (internalização em células e em organoides celulares), mostrando que a nanopartícula multifuncional obtida constitui um sistema potencial para teranóstico tumoral.

LIU *et al.* (2018) prepararam microesferas de PMMA com curcumina. A metodologia empregada aplicou os princípios de emulsão *pickering*<sup>5</sup>, utilizando nanocristais de celulose como agente estabilizador da emulsão. A fase oleosa do meio reacional foi composta por PMMA, pré-formado e solubilizado em diclorometano na presença de curcumina. A emulsão foi obtida por agitação manual e as microesferas foram precipitadas via evaporação de solvente. As microesferas de PMMA-curcumina recobertas por nanocristais de celulose apresentaram boa fotoestabilidade. O trabalho apresentou, portanto, uma rota efetiva para a produção de nova microesfera biofuncional, como potencial carreadora de compostos bioativos.

ABDELGHANY *et al.* (2019) produziram microagulhas de poli(álcool vinílico) (PVA) carregadas com nanossuspensão de curcumina. A nanossuspensão foi preparada via método de nanoprecipitação. As nanopartículas de curcumina foram ressuspensas em água e PVA foi adicionado ao sistema. A mistura foi vertida em molde para confecção das microagulhas sob centrifugação. As microagulhas obtidas foram submetidas a ensaios de dissolução *in vitro*, mostrando que após a nanoprecipitação a curcumina é solubilizada significativamente mais rápido. Portanto, o sistema desenvolvido e estudado sugere a distribuição de curcumina no organismo via intradérmica como alternativa viável.

---

<sup>5</sup>Emulsão *pickering* (*pickering emulsion*) é uma emulsão que é estabilizada por partículas sólidas que se adsorvem na interface entre as duas fases (LIU *et al.*, 2018).

PONTES-QUERO *et al.* (2021) projetaram nanopartículas carregadas com curcumina baseadas em um sistema terpolímico de natureza anfifílica (baseado em metacrilato de  $\alpha$ -tocoferol, 1-vinil-2-pirrolidona e N-vinilcaprolactama), visando à liberação controlada da curcumina no tratamento de doenças relacionadas à inflamação e ao estresse oxidativo. O potencial anti-inflamatório desse nanossistema foi indicado pela redução de diferentes fatores pró-inflamatórios em células RAW 264.7 e a biocompatibilidade *in vivo* foi confirmada em um modelo de rato por meio da injeção subcutânea das dispersões de nanopartículas.

Além das propriedades fluorescentes da curcumina, muitos trabalhos também abordam a utilização deste corante como fotossensibilizador em terapia fotodinâmica (TFD), devido à capacidade de geração espécies reativas de oxigênio (EROs). A TFD é uma modalidade de tratamento baseada na fotoativação de um fotossensibilizador com luz de comprimento de onda adequado, induzindo a geração de espécies citotóxicas em locais infecciosos. MINHACO *et al.* (2023) realizaram o encapsulamento da curcumina em nanopartículas poliméricas, a fim de impedir a degradação deste corante em meio biológico, utilizaram poli(ácido lático-co-ácido glicólico) (PLGA) como polímero. Visando à aplicação em TFD, o nanossistema obtido foi testado em biofilmes endodônticos e apresentaram uma atividade antimicrobiana efetiva.

Como pôde ser observado nos trabalhos expostos, as metodologias empregadas consistem na utilização de polímeros pré-formados ou sintetizados previamente à interação com a curcumina. Todos os trabalhos que envolvem associação da curcumina ao polímero empregaram o princípio de impregnação da matriz polimérica com a biomolécula. Sendo assim, será avaliada no presente trabalho a influência da curcumina no mecanismo e cinética de polimerização via radicais livres, quando introduzida *in situ*.

### **2.3.2 Nanopartículas fluorescentes e magnéticas**

Trabalhos recentes associam nanopartículas magnéticas (NPMs) a polímeros e curcumina, como opções de diagnóstico, tratamento ou teranóstico. A Tabela 2 reúne os trabalhos mais relevantes na área, em que os nanossistemas são direcionados a aplicações em saúde, preferencialmente no campo da oncologia. São apresentados a seguir trabalhos que combinam curcumina com NPMs e/ou polímeros, sem que necessariamente os três elementos estejam presentes, como detalhados a seguir.

**Tabela 2.** Revisão da literatura de trabalhos envolvendo nanopartículas fluorescentes e magnéticas.

<b>Título</b>	<b>Estrutura e composição</b>	<b>Referência</b>
<i>Folic Acid-Conjugated Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Based on Bovine Serum Albumin (BSA) for Targeted Delivery of Curcumin to Suppress Liver Cancer Cells</i>	Nanopartículas de óxido de ferro, recobertas com BSA, contendo curcumina e ácido fólico	(FELENJI <i>et al.</i> , 2022)
<i>Curcuminoids-conjugated multicore magnetic nanoparticles: Design and characterization of a potential theranostic nanoplatform</i>	Nanopartículas de óxido de ferro, recobertas por extrato de cúrcuma, encapsuladas em sílica (Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> -Cur@SiO <sub>2</sub> )	(SANTOS <i>et al.</i> , 2021)
<i>Long-term biodistribution and toxicity of curcumin capped iron oxide nanoparticles after single-dose administration in mice</i>	Nanopartículas de óxido de ferro encapsuladas em curcumina (Cur-IONPs)	(ELBIALY; ABOUSHOUSHAH; ALSHAMMARI, 2019)
<i>Enhancing the anti-gastric cancer activity of curcumin with biocompatible and pH sensitive PMMA-AA/ZnO nanoparticles.</i>	Nanopartículas de ZnO carregadas com curcumina encapsuladas com copolímero PMMA-AA (Cur/PMMA-AA/ZnO NPs)	(DHIVYA <i>et al.</i> , 2018)
<i>Biocompatible curcumin loaded PMMA-PEG/ZnO nanocomposite induce apoptosis and cytotoxicity in human gastric cancer cells.</i>	Bionanocompósito de PMMA-PEG/ZnO carregado com curcumina	(DHIVYA <i>et al.</i> , 2017)
<i>Biocompatible and fluorescent superparamagnetic iron oxide nanoparticles with superior magnetic properties coated with charged polysaccharide derivatives.</i>	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas biocompatíveis com curcumina incorporada (SPION-CCh) e revestidas com camada ultrafina de conjugado ácido hialurônico-curcumina (SPION-CCh/HA-Cur)	(LACHOWICZ <i>et al.</i> , 2017)
<i>Curcumin-conjugated magnetic nanoparticles for detecting amyloid plaques in Alzheimer's disease mice using magnetic resonance imaging (MRI).</i>	Óxido de ferro superparamagnético (SPIO) conjugado com curcumina Cur-MNPs	(CHENG <i>et al.</i> , 2015)

CHENG *et al.* (2015) sugeriram a substituição de técnicas diagnósticas por imagem, que empregam radioatividade, por técnicas de RMN baseadas em nanossistemas magnéticos. Curcumina, associada a nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e recobertas pelo copolímero em bloco PEG-PLA e pelo homopolímero PVP foi avaliada quanto à especificidade em relação a placas amiloides. Os resultados mostraram que os nanossistemas têm potencial para o diagnóstico não invasivo da doença de Alzheimer, empregando a técnica de RMN.

Nanossistemas compostos por nanopartículas de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  encapsuladas em quitosana foram preparados por HUONG *et al.* (2016), contendo elevado teor de curcumina. Os nanossistemas apresentaram elevada capacidade de internalização celular, que foi incrementada, para o tecido tumoral, pela associação de ácido fólico na superfície do nanomaterial. Além disso, o nanossistema apresentou a capacidade de aquecimento por indução magnética, tornando possível inativar as células cancerígenas por hipertermia. Assim, o sistema serviu como uma combinação apropriada de tratamento quimioterápico, intermediado por curcumina, e de hipertermia magnética.

LACHOWICZ *et al.* (2017) relataram a fabricação de novos compostos magnéticos e fluorescentes à base de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro revestidos com derivado do biopolímero ácido hialurônico, contendo curcumina como marcador fluorescente. No trabalho, foi avaliada a inserção da curcumina embutida no núcleo da nanopartícula, bem como associada à superfície do revestimento polimérico. Ambos os sistemas apresentaram propriedades magnéticas compatíveis; no entanto, a fluorescência foi mais pronunciada para o sistema em que o fluoróforo revestiu a partícula. Os sistemas não apresentaram citotoxicidade a células epiteliais, além de terem apresentado fácil penetração celular. As nanopartículas desenvolvidas se mostraram candidatas promissoras para diagnósticos, tanto por ressonância, quanto por fluorescência.

Com o objetivo de aumentar a biodisponibilidade e eficácia da curcumina para o combate ao câncer, DHIVYA *et al.* (2017, 2018) desenvolveram nanocompósitos de P(MMA-co-EG)/ZnO e P(MMA-co-AA)/ZnO carregados com curcumina insolúvel. O núcleo de ZnO foi escolhido por ser estável e não apresentar toxicidade em pH 7, mas solubilizar rapidamente em pH inferior a 6, favorecendo a liberação de fármacos em tumores, além de apresentar incremento de toxicidade quando decomposto em íons  $\text{Zn}^{2+}$ .

Estes estudos mostraram o potencial clínico dos nanossistemas que contêm curcumina para a indução da apoptose de células cancerígenas.

ELBIALY *et al.*, (2019) avaliaram a toxicidade e biodistribuição de nanopartículas de óxido de ferro recobertas por curcumina em ensaio *in vivo*. Os resultados mostraram que as nanopartículas recobertas pelo fluoróforo foram absorvidas principalmente pelo fígado e baço. No entanto, também foi observado acúmulo significativo no cérebro, em função de uma penetração bem-sucedida pela barreira hematoencefálica. Por fim, foi concluído que a nanoplateforma pode ser considerada suficientemente segura para fins diagnósticos e terapêuticos.

SANTOS *et al.* (2021) desenvolveram um nanossistema magnético carreador de curcuminoides encapsulado em sílica. Neste, o extrato de cúrcuma foi adsorvido em nanopartículas de magnetita e posteriormente foi realizada a etapa de encapsulamento em sílica, resultando em um nanossistema com múltiplos núcleos magnéticos. As propriedades magnéticas e fluorescentes foram confirmadas, mostrando potencial bimodal para rastreamento celular, além de aplicações teranósticas.

Considerando as interações biológicas e a estratégia de entrega sítio-dirigida, FELENJI *et al.* (2022) desenvolveram nanopartículas magnéticas recobertas com BSA, como carreadora de curcumina, contendo ácido fólico para conferir seletividade tumoral. Os resultados da internalização celular da nanoestrutura mostraram que as células hepáticas internalizam de forma eficiente as nanoestruturas. Também mostraram que o tratamento com esta nanoestrutura reduziu a sobrevivência celular e induziu a apoptose em células cancerígenas HepG2.

### **2.3.3 Teranóstico com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro**

A área de teranóstico tem despertado grande interesse na comunidade científica nos últimos anos, devido à capacidade de combinar terapia e diagnóstico em uma abordagem integrada, além da possibilidade de tratamento personalizado, direcionado e monitorado de forma não invasiva. Entre as diversas estratégias empregadas para teranóstico, o uso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles* - SPIONs) tem se destacado como uma alternativa promissora. Estas partículas em nanoescala possibilitam, em uma mesma aplicação, o diagnóstico por imagem (RMN ou TC) e o tratamento por hipertermia

magnética. Para detalhar os avanços em teranóstica com nanopartículas superparamagnéticas, foi realizada uma busca sistemática (no período de 1945-2023) na base de dados *Web of Science* (Tabela 3), com destaque para estudos clínicos. Vale destacar que esta área apresenta muitos trabalhos *in vitro*, embora apresente poucos avanços ainda no cenário médico.

**Tabela 3.** Revisão da literatura de trabalhos envolvendo teranóstico empregando SPION.

Busca	Estratégia de busca	Nº de documentos encontrados	Nº de documentos válidos
1	<i>Magnetic hyperthermia (Title) AND clinical (Title)</i>	27	10
2	<i>SPION (Title) AND diagnostic imaging (All Fields)</i>	12	6
3	<i>SPION (Title) AND tomography (All Fields)</i>	5	0
<b>TOTAL</b>		<b>44</b>	<b>16</b>

Nota: Base de dados *Web of Science*, acessada em 25 de junho de 2023.

A busca sistemática sumarizada da Tabela 3 resultou em 44 documentos, dos quais foram eliminados 28 artigos, segundo os seguintes critérios de exclusão: foco apenas na síntese das nanopartículas (7 artigos), foco em validação de equipamentos (3 artigos), foco em modelagem computacional (3 artigos), não apresentar estudo *in vivo* (5 artigos), ser artigo de revisão (9 artigos) e aparecer duplicado na busca (1 artigo). Dos 16 artigos válidos, 6 destacam o diagnóstico por RMN, 7 apresentam ensaios pré-clínicos de tratamento por hipertermia magnética em modelo animal, 1 apresenta ensaios clínicos em humanos e 2 avaliam tanto diagnóstico quanto tratamento (teranóstico). Os estudos mais relevantes (7 artigos) foram agrupados na Tabela 4 e detalhados nos parágrafos seguintes.

Um dos primeiros estudos clínicos foi realizado por OLESON; HEUSINKVELD; MANNING (1983), em que foi aplicado um protocolo de indução de hipertermia magnética em 31 pacientes, empregando um eletrodo cilíndrico de raio de 24,5 cm e frequência de 13,56 MHz. Tal protocolo foi realizado em combinação com radioterapia. Os dados mostraram ausência de toxicidade aguda, relatada apenas em dois dos pacientes, que apresentaram bolhas cutâneas. Contudo, este estudo relata dificuldade em avaliar a eficiência do tratamento, devido à curta sobrevivência dos pacientes, que se encontravam no estágio terminal da doença.

**Tabela 4.** Revisão da literatura de trabalhos envolvendo teranóstico clínico com nanopartículas superparamagnéticas.

<b>Título</b>	<b>Tipo de câncer</b>	<b>Referência</b>
<i>Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy</i>	Vários tipos tumorais	LIU <i>et al.</i> (2020)
<i>Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme</i>	Glioblastoma	MAIER-HAUFF <i>et al.</i> (2011)
<i>Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer</i>	Câncer de próstata	JOHANNSEN <i>et al.</i> (2010)
<i>Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial</i>	Câncer de próstata	JOHANNSEN <i>et al.</i> (2007)
<i>Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme</i>	Glioblastoma	MAIER-HAUFF <i>et al.</i> (2007)
<i>Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy – feasibility, tolerance and achieved temperatures.</i>	Vários tipos tumorais e foco de câncer de próstata	WUST <i>et al.</i> (2006)
<i>Hyperthermia by magnetic induction .2. Clinical experience with concentric electrodes</i>	Vários tipos tumorais	OLESON; HEUSINKVELD; MANNING (1983)

Mais recentemente, foi comprovado que a hipertermia magnética intracelular constitui um método terapêutico viável, controlável e não invasivo e que, portanto, pode ser consolidado como tratamento para condições patológicas humanas. Atualmente, a *MagForce Nanotechnologies AG* (Alemanha) é a única empresa que utiliza nanopartículas de óxido de ferro para tratamento de tumores por hipertermia, apresentando ensaios clínicos em fase avançada. O fluido magnético MFL AS (*NanoTherm*<sup>®</sup>, *MagForce*) consiste em nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas dispersas em água com uma concentração de ferro de 112 mg/mL. O fluido magnético é espalhado uniformemente no tumor e, para o tratamento, é aplicado um campo magnético de 100 kHz, com intensidade variável de 0–18 kA/m, gerada no equipamento MFH 300F (LIU *et al.*, 2020).

Em 2007, foi realizada uma pesquisa em 14 pacientes com glioblastoma (2 com tumores primários e 12 com recorrências), usando uma injeção lenta neuroguiada de fluido magnético. Além disso, usando um processo chamado de análise post-instalação, a *MagForce* gerou um método para analisar a temperatura intratumoral, instalando um cateter de termometria diretamente no tumor, após a injeção das nanopartículas, permitindo assim acompanhar o incremento de temperatura, atingindo uma máxima intratumoral de 44,6 °C (MAIER-HAUFF *et al.*, 2007). Em um estudo maior de fase II envolvendo 59 pacientes com glioblastoma recorrente, a radioterapia combinada com hipertermia magnética resultou em uma sobrevida global significativamente prolongada após o diagnóstico de recorrência do tumor, quando comparado com um grupo de controle (MAIER-HAUFF *et al.*, 2011). Na Europa, essas descobertas levaram à aprovação pela *European Medicines Agency* (EMA) de um produto a base de NPMs (*NanoTherm*<sup>®</sup> AS1, *MagForce*) para aplicação da hipertermia magnética em combinação com radioterapia em pacientes com glioblastoma recorrente.

Esta abordagem foi relatada, além do glioblastoma, para tratamento de tumores residuais de próstata, cérvix uterina e sarcoma de tecidos moles. A administração de fluido magnético foi guiada por exame de imagem (tomografia computadorizada, ultrassonografia ou fluoroscopia guiada por raios X) ou, quando isso não foi possível, uma injeção intraoperatória sob visão controlada. Foi mostrada assim a segurança e baixa toxicidade do protocolo aplicado em mais tipos tumorais, além do glioblastoma. Contudo, não há relato da eficiência do processo nestes casos, provavelmente devido ao estágio avançado da doença, tratando-se de recidivas, precedentemente tratadas com outros

procedimentos (WUST *et al.*, 2006). O mesmo protocolo foi aplicado para tratamento de câncer de próstata em dez pacientes, em que o fluido magnético foi injetado transperinealmente sob ultrassom transretal e fluoroscopia guiada. Neste caso, a termometria foi realizada invasivamente, relatando permanência das partículas após 6 semanas (implicando a necessidade de apenas uma dose de partículas) e temperaturas intratumorais médias de 40,1 °C. Declínios do antígeno prostático específico (PSA) foram observados em oito pacientes (JOHANNSEN *et al.*, 2007).

Em um estudo de revisão da literatura, JOHANNSEN *et al.* (2010) relataram que o aquecimento intersticial usando nanopartículas magnéticas é viável em pacientes com câncer de próstata, sendo que a toxicidade relacionada ao tratamento pode ser considerada moderada e a qualidade de vida é prejudicada apenas temporariamente. No entanto, o desconforto em campos magnéticos mais fortes e a distribuição irregular de calor intratumoral são os fatores limitantes desta técnica. Em contraste, a deposição de nanopartículas nas próstatas é altamente durável. Desde então, os estudos clínicos do *NanoTherm*<sup>®</sup> para teranóstico em câncer de próstata estão avançando. Em 2019, a *MagForce USA Inc.* relatou a conclusão da primeira etapa de seu principal estudo clínico nos EUA para a ablação focal de câncer de próstata de risco intermediário, relatando a validação de um procedimento clínico padronizado pelo qual o *NanoTherm*<sup>®</sup> é colocado em um volume clínico (CTV) de menos de 2 a 4 cm<sup>3</sup> de volume na próstata humana, fornecendo uma terapia de ablação focal para o câncer de próstata (*MagForce AG Publishes*).

Dado o exposto, as estratégias encontradas na literatura consideram a possibilidade de liberação da curcumina, após introdução do nanossistema no organismo. No entanto, seria relevante o desenvolvimento de um nanossistema em que a curcumina estivesse acoplada à nanopartícula magnética sem possibilidade de liberação, garantindo a obtenção de uma nanopartícula bimodal estável, magnética e fluorescente. Neste contexto, a proposta do presente trabalho foi desenvolver um sistema à base de nanopartículas magnéticas e fluorescentes. A estratégia consiste no encapsulamento de nanopartículas magnéticas em nanopartículas poliméricas contendo extrato de cúrcuma a partir de uma abordagem inédita, em que a curcumina, a partir do extrato, será incorporada no monômero junto com as nanopartículas magnéticas, compondo a fase dispersa na polimerização por miniemulsão direta.

### 3 CAPÍTULO III

## Desenvolvimento de Material Polimérico Fluorescente Contendo Extrato de Cúrcuma

Quem espera que a vida  
Seja feita de ilusão  
Pode até ficar maluco  
Ou morrer na solidão  
É preciso ter cuidado  
Pra mais tarde não sofrer  
É preciso saber viver

Toda pedra do caminho  
Você pode retirar  
Numa flor que tem espinhos  
Você pode se arranhar  
Se o bem e o mal existem  
Você pode escolher  
É preciso saber viver

É preciso saber viver  
É preciso saber viver  
É preciso saber viver  
Saber viver, saber viver!

Quem espera que a vida  
Seja feita de ilusão  
Pode até ficar maluco  
Ou morrer na solidão  
É preciso ter cuidado  
Pra mais tarde não sofrer  
É preciso saber viver

Toda pedra do caminho  
Você pode retirar  
Numa flor que tem espinhos  
Você pode se arranhar  
Se o bem e o mal existem  
Você pode escolher  
É preciso saber viver

É preciso saber viver  
É preciso saber viver  
É preciso saber viver  
Saber viver, saber viver!

É Preciso Saber Viver (Erasmus Carlos e Roberto Carlos)

### 3.1 Contextualização

Nos últimos anos, a comunidade científica tem investigado cada vez mais o uso de compostos naturais para aplicações biomédicas (KOPARDE; DOIJAD; MAGDUM, 2019). Isso é corroborado pelo fato de que compostos químicos derivados de fontes naturais (plantas, animais ou microrganismos) podem apresentar atividades biológicas e medicinais (JI; LI; ZHANG, 2009). Consequentemente, compostos naturais são potenciais alvos de pesquisa para o desenvolvimento de novos fármacos e novas terapias biomédicas (THOMFORD *et al.*, 2018; AUDELO, *et al.*, 2019). Particularmente, fluoróforos sintéticos e naturais são compostos versáteis que podem ser usados para a fabricação de dispositivos de detecção baseados em fluorescência (MÉRIAN *et al.*, 2012; ZHANG *et al.*, 2017).

Entre os inúmeros compostos naturais, a curcumina se destaca por suas atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e antitumoral, sendo considerada um fluoróforo natural. A curcumina é o principal componente bioativo extraído do rizoma da planta *Curcuma longa* (conhecido popularmente como cúrcuma ou açafrão-da-terra), sendo responsável pela cor amarela da planta e constituindo cerca de 75 % do total de curcuminoides (SHIRSATH *et al.*, 2017; KHARAT *et al.*, 2017). Apesar de suas muitas propriedades vantajosas em potencial, o uso prático da curcumina é limitado pela característica baixa solubilidade em água (400 ng/mL em pH 7,4), baixa estabilidade em meio biológico, baixa fotoestabilidade e pouca biodisponibilidade (TØNNESEN *et al.*, 2002; TSUDA, 2018).

Uma solução promissora para superar os problemas de instabilidade da curcumina, mantendo suas propriedades medicinais e fluorescentes, é sua incorporação em matrizes poliméricas, o que pode aprimorar a biodisponibilidade e a capacidade de ultrapassar barreiras fisiológicas (DEL PRADO-AUDELO *et al.*, 2019). Essa abordagem para objetivos semelhantes foi relatada na literatura para outras drogas e compostos bioativos (CASTOR *et al.*, 2019). No caso particular da curcumina, diferentes materiais poliméricos já foram utilizados para o encapsulamento desse fluoróforo em partículas poliméricas com características morfológicas distintas, a saber: microagulhas de poli(álcool vinílico) (PVA) (ABDELGHANY *et al.*, 2019); microesferas de poli(metacrilato de metila) (PMMA) (LIU *et al.*, 2018); nanopartículas de poli(láctido)-tocoferil polietileno glicol succinato (PLA-TPGS) (NGUYEN *et al.*, 2016); polilactídeo

(PLA), polivinilpirrolidona (PVP) e poli(etileno glicol) (PEG) microfibras (YAKUB *et al.*, 2016); nanopartículas de poli(N-isopropilacrilamida-cometacrílico) (PNIPAAm-MAA) (ZEIGHAMIAN *et al.*, 2016); nanoesferas de poli (metil metacrilato-co-2-hidroxietil metacrilato) (P(MMA-HEMA)) (SOBH *et al.*, 2015); e nanopartículas de copolímero N-isopropilacrilamida/N-vinil-2-pirrolidona/poli(etilenoglicol)monoacrilato (NIPAAAM/VP/PEG-A) (BISHT *et al.*, 2007). Em geral, esses estudos realizaram a impregnação da matriz polimérica previamente preparada com a biomolécula como procedimento de incorporação.

Por outro lado, a incorporação *in situ* de moléculas durante a etapa de polimerização pode permitir a inclusão dos compostos ativos na matriz polimérica em uma única etapa, pois os compostos ativos são dissolvidos ou dispersos diretamente na carga de monômero antes da reação de polimerização. Este procedimento de incorporação em uma etapa também dispensa o uso de solventes orgânicos, que são necessários para solubilizar o polímero pré-formado e/ou o composto bioativo durante a incorporação da carga de fluoróforo, o que pode ser vantajoso do ponto de vista econômico, técnico e ambiental. Adicionalmente, além da facilidade de incorporação, o processo *in situ* também pode permitir o aumento do teor ativo do composto incluído no sistema polimérico produzido (NGWULUKA, 2010). Dentre os diversos polímeros sintéticos disponíveis, o PMMA é um polímero obtido a partir da polimerização do monômero metacrilato de metila (MMA), apresentando boas propriedades mecânicas, fácil manuseio e processamento, boa resistência química, boas propriedades térmicas e baixo custo. Além disso, o PMMA é conhecido por sua baixa toxicidade, boa biocompatibilidade e amplo uso em aplicações biomédicas (CASTOR *et al.*, 2019).

Com base nos parágrafos anteriores, o objetivo principal do presente estudo foi avaliar a estabilidade do extrato de cúrcuma na presença de diferentes solventes, incluindo o monômero MMA e o co-monômero ácido acrílico (AA). O uso de AA como co-monômero pode permitir a melhoria do desempenho biomédico das matrizes poliméricas produzidas por meio do ajuste adequado da hidrofiliabilidade e introdução de grupos reativos de ácido carboxílico nas superfícies das partículas de polímero. Os grupos carboxílicos podem ser usados posteriormente para funcionalização de nanopartículas, permitindo melhoria da biocompatibilidade, propriedades de adesão e estabilidade de dispersão das nanopartículas funcionalizadas (CAMPOS *et al.*, 2020; MANGIA *et al.*, 2021). Além disso, também foi realizada a incorporação *in situ* deste fluoróforo em uma

matriz polimérica à base de PMMA para melhorar sua fotoestabilidade. Até onde sabemos, estudos semelhantes nunca foram realizados anteriormente com os sistemas investigados. Para alcançar os objetivos almejados, reações de polimerização de MMA em massa foram realizadas na presença de curcumina (componente majoritário do extrato de cúrcuma) e sua cinética de polimerização foi avaliada. Posteriormente, foram realizados ensaios em fotorreator a fim de avaliar a fotoestabilidade do polímero-fluoróforo. Por fim, foi realizado um planejamento experimental fatorial completo de 3 níveis para otimizar as condições de reação, a fim de preparar um copolímero P(MMA-co-AA) fluorescente com alto rendimento da conversão de polimerização.

## **3.2 Materiais e métodos**

### **3.2.1 Especificação dos insumos**

O extrato de cúrcuma utilizado foi obtido de uma amostra comercial de cúrcuma em pó (Kitano, São Paulo, Brasil), adquirida com pureza comercial em grau alimentício. Pastilhas de hidróxido de sódio (NaOH, 97% em peso de pureza mínima), ácido clorídrico (HCl, solução de 37% em peso em água), etanol (99,5% em peso de pureza mínima), acetona (99,5% em peso de pureza mínima), MMA (monômero, 99,5% em peso de pureza mínima), AA (monômero, 99,5% em peso de pureza mínima) e peróxido de benzoíla (PBO, iniciador, teor máximo de 25% de umidade) foram fornecidos por VETEC Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). Todos os produtos químicos foram usados sem purificação prévia.

### **3.2.2 Obtenção do extrato de cúrcuma**

A obtenção do extrato de cúrcuma foi realizada por sonicação (Branson Digital Sonifier®, modelo 450, Connecticut, Estados Unidos) para maximizar o rendimento da extração (SHIRSATH *et al.*, 2017). A cúrcuma em pó foi dispersa no monômero (MMA, AA ou misturas de MMA e AA), na proporção de 1:6 p/p (cúrcuma:monômero), com auxílio de ponteira de ultrassom a 120 W (frequência constante de 20 KHz) por 30 min sob banho de gelo. Posteriormente, os sólidos foram removidos por filtração a vácuo e a solução resultante foi filtrada em membrana PTFE (tamanho de poro de 0,45 µm) para remover as partículas residuais.

### 3.2.3 Estabilidade do extrato de cúrcuma em solventes e monômeros

Para avaliar a estabilidade do extrato de cúrcuma, à luz ambiente e à temperatura ambiente, em meio aquoso (básico e ácido) e em solvente orgânico (etanol), uma alíquota do extrato de cúrcuma, previamente extraído em acetona (realizado conforme descrito por DA ROCHA *et al.* (2019)) foi solubilizada nos respectivos meio: solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH 0,1 mol L<sup>-1</sup>), solução aquosa de ácido clorídrico (HCl 0,1 mol L<sup>-1</sup>) e etanol (EtOH 1,0 mol L<sup>-1</sup>). As soluções preparadas foram filtradas através de uma membrana de PTFE (tamanho de poro de 0,45 µm) para remover as partículas residuais, foram diluídas em fator de 10 e caracterizadas por espectrofotometria.

As medidas espectroscópicas foram realizadas no modo de absorvância com o espectrômetro *ThermoScientific*, modelo *MultiskanGO*, EUA), na faixa de comprimento de onda de 200 a 1000 nm, com passo de 1 nm. Os dados espectrais foram armazenados como médias de 128 varreduras. Em todos os casos, a estabilidade foi avaliada pela variação da absorvância das amostras armazenadas em frascos de vidro transparentes e lacrados à temperatura ambiente por um período de 10 dias.

A absorvância do extrato de cúrcuma no monômero (produzido conforme descrito na Seção 3.2.2) foi monitorada por espectrofotometria à temperatura ambiente por cerca de um mês, conforme descrito no parágrafo anterior. As amostras com MMA, AA e misturas de MMA:AA (9:1 peso/peso) foram estudadas para avaliar a influência da mistura de co-monômeros (variação do caráter polar e ácido, introduzido pela presença de grupos funcionais carboxila) na estabilidade, o que pode ser útil para futuras aplicações biológicas.

### 3.2.4 Reações de polimerização em massa

Reações de polimerização de MMA em massa foram realizadas com a incorporação *in situ* do extrato de cúrcuma. Para comparação, as polimerizações de MMA em massa também foram realizadas sem o composto ativo. As polimerizações foram realizadas em tubos de ensaio contendo 2,0 g do meio reacional e colocados em banhos térmicos mantidos a temperatura constante e controlada (80 °C). As reações foram realizadas em triplicata, com tempo reacional de 30 min. O rendimento da polimerização foi obtido por gravimetria após interrupção da reação, colocando o respectivo tubo de ensaio em banho de gelo e secando a amostra sob vácuo até massa constante. Os polímeros finais foram removidos dos tubos, macerados e reservados, em frascos de vidro

e mantidos sem exposição à luz, para caracterizações futuras quanto à fluorescência dos polímeros obtidos.

Para a avaliação da cinética de polimerização por modelagem fenomenológica, as polimerizações em massa foram realizadas com o extrato de cúrcuma (preparado conforme descrito na Seção 3.2.2) diluído em monômero nas concentrações de 0,5% em peso (cúrcuma:MMA). O iniciador (PBO) foi empregado na concentração de 3,0% em peso (em relação ao monômero) e a reação foi realizada nas temperaturas (banho térmico) de 70 °C, 80 °C e 90 °C. Cada ponto das trajetórias cinéticas corresponde a um tubo de ensaio diferente.

Para a avaliação da cinética de polimerização e eficiência de fluorescência por modelagem empírica, foi empregada uma mistura de monômeros acrílicos (9MMA:1AA em massa) e a concentração do extrato de cúrcuma em monômeros foi variada de 0,1%, 0,3% e 0,5%, seguida pela variação do PBO em 1,0%, 3,0% e 5,0%. As reações, no caso do planejamento experimental, foram realizadas a 80 °C.

### **3.2.5 Caracterizações de distribuição de massas molares**

As distribuições de massas molares dos materiais poliméricos obtidos foram medidas com um cromatógrafo de permeação em gel (GPC, *Malvern Viscotek*, modelo *Max VE2001*, Reino Unido), equipado com colunas lineares KF 804L e KF-805L, fornecido pela Showa Denko KK (Japão), com tamanhos máximos de poros de  $1,5 \times 10^3$  Å e  $5 \times 10^3$  Å, e um detector refratométrico (*Malvern Viscotek*, modelo *VE3580*, Reino Unido) operando a 40 °C. As análises foram realizadas solubilizando os polímeros em tetraidrofurano (THF) grau HPLC e as amostras padrões de PMMA foram usadas para calibração na faixa de  $1 \times 10^3$  a  $1 \times 10^6$  Da.

### **3.2.6 Estabilidade em estado sólido**

A estabilidade no estado sólido foi avaliada na amostra de polímero fluorescente (PMMA\_C) obtida após o término da reação e a amostra foi inicialmente macerada antes da exposição à luz. Para o experimento com a luz UVA ( $\lambda = 315$  a  $380$  nm), foram utilizadas 16 lâmpadas fluorescentes de mercúrio, com potência de 8 W (modelo BLB F8T5). Para o experimento com luz branca LED ( $\lambda = 400$  a  $700$  nm), foi utilizado um refrator de luz branca, com potência de 50 W. Em ambos os casos, o pó de polímero foi colocado em uma cubeta quadrada de quartzo projetada para sólidos, com  $1,0 \text{ cm}^2$  de área

de exposição e a fonte de luz foi posicionada a 20 cm de distância da cubeta que continha a amostra. O teste foi realizado a 25 °C usando o fotorreator TE-383 (Tecnal, São Paulo, Brasil).

A fotodegradação foi monitorada por meio de medições espectroscópicas realizadas com um espectrofotômetro UV 2450-vis (Shimadzu, Japão) e as medições de emissão de fluorescência foram realizadas com o fluorímetro FS5 (Edinburgh Instruments, Escócia) em diferentes intervalos de tempo de irradiação. Adicionalmente, os comportamentos da fluorescência das amostras de homopolímero (PMMA\_C) e copolímero (P(MMA-co-AA)\_C) foram avaliados por fluorescência de microscopia óptica.

As imagens de fluorescência foram adquiridas usando um instrumento de microscópio fluorescente invertido Observer.Z1 (Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a apótome, em exposições de cerca de 200 ms, na faixa, azul ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ ), verde ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) e vermelho ( $\lambda_{\text{ex}} = 594 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ ).

### 3.2.7 Modelagem fenomenológica

Para descrever o mecanismo cinético de polimerização do MMA na presença do extrato de cúrcuma, optou-se por utilizar inicialmente o modelo cinético clássico que descreve a polimerização do MMA, do tipo polimerização por adição em cadeia. O mecanismo cinético para a polimerização do MMA é composto pelas seguintes etapas: iniciação, propagação, transferência de cadeia para o monômero e terminação (por combinação e desproporcionamento) (VERROS; ACHILIAS; GIANNOUKOS, 2011), e as equações estão descritas na Tabela 5. Para incluir o efeito do extrato de cúrcuma no mecanismo cinético, duas novas etapas foram adicionadas a este mecanismo: (i) a curcumina atuando como agente de transferência de cadeia e (ii) a curcumina atuando como agente de terminação. Com isso, é possível definir as expressões para as taxas individuais de reação de cada componente.

Por conta da quantidade de equações diferenciais necessárias para a resolução dos balanços de massa de todas as espécies, é comum em sistemas de polimerização o uso da técnica chamada de método dos momentos (RAY, 1972). O modelo matemático foi implementado em MATLAB, usando a função 'ode23t' para integrar o sistema final de equações pela técnica de BDF, com tolerância relativa e absoluta de  $10^{-8}$ .

**Tabela 5.** Etapas e equações do mecanismo de polimerização do MMA com extrato de cúrcuma.

Etapa		Reação	Taxa
Iniciação	Decomposição	$I \xrightarrow{k_{id}} 2R$	$R_{id} = k_{id} \cdot I$ (1)
	Iniciação da cadeia	$R + M_1 \xrightarrow{k_{ic}} P_1$	$R_{ic} = k_{ic} \cdot R \cdot M$ (2)
Propagação		$P_i + M_1 \xrightarrow{k_p} P_{i+1}$	$R_p = k_p \cdot P_i \cdot M$ (3)
Transferência de cadeia para o monômero		$P_i + M_1 \xrightarrow{k_{tm}} P_1 + \Lambda_i$	$R_{tm} = k_{tm} \cdot P_i \cdot M$ (4)
Transferência de cadeia para a curcumina		$P_i + CU \xrightarrow{k_{tcu}} P_{i-1} + \Lambda_i$	$R_{tcu} = k_{tcu} \cdot P_i \cdot CU$ (5)
Terminação	Combinação	$P_i + P_j \xrightarrow{k_{tc}} \Lambda_{i+j}$	$R_{tc} = k_{tc} \cdot P_i \cdot P_j$ (6)
	Desproporcionamento	$P_i + P_j \xrightarrow{k_{td}} \Lambda_i + \Lambda_j$	$R_{td} = k_{td} \cdot P_i \cdot P_j$ (7)
Curcumina como agente de terminação		$P_i + CU \xrightarrow{k_{tcu}} \Lambda_i$	$R_{tcu} = k_{tcu} \cdot P_i \cdot CU$ (8)

Com o mecanismo cinético definido, é possível escrever as equações de balanço de massa para cada componente, aplicar a técnica dos momentos e, em seguida, fazer a estimativa dos parâmetros cinéticos. Conversão, massa molar média numérica (Mn) e ponderal (Mw) e índice de polidispersão (PDI) são as possíveis respostas do modelo, utilizadas para fins de estimativa de parâmetros. A modelagem cinética proposta para descrever a polimerização do MMA na presença do extrato de cúrcuma está detalhada no Apêndice A. Ao final do processo de estimativa, é possível fazer a otimização das condições da reação para encontrar a quantidade máxima do extrato de cúrcuma que pode ser introduzida ao sistema, para garantir o máximo de fluorescência do composto polimérico sem afetar significativamente na conversão do monômero.

### 3.2.8 Modelagem empírica

Um planejamento fatorial completo de 3 níveis foi realizado para avaliar a cinética das reações de polimerização em massa de MMA:AA (9:1 em peso) na presença de extrato de cúrcuma (0,5% em peso em relação ao monômero) e a fotoestabilidade dos polímeros obtidos. Os polímeros fluorescentes foram preparados com cargas distintas de iniciador [PBO] e fluoróforo [C] e foram caracterizados por fluorescência em estado sólido. As faixas de variação das variáveis manipuladas foram definidas de acordo com os resultados experimentais obtidos durante os estudos exploratórios iniciais e são apresentadas na Tabela 6. O planejamento fatorial proposto é apresentado na Tabela 7.

Vale destacar que se optou por avaliar o desempenho do copolímero fluorescente P(MMA-co-AA)-C com mais detalhes, devido ao aumento da estabilidade fotoquímica do fluoróforo promovido pelo co-monômero AA, conforme observado experimentalmente.

**Tabela 6.** Intervalo de variação das variáveis de entrada do planejamento fatorial completo a três níveis.

Variável	-1	0	+1
[PBO]	1%	3%	5%
[cúrcuma]	0,1%	0,3%	0,5%

**Tabela 7.** Plano experimental fatorial completo a três níveis.

Experimento	$z_1$	$z_2$
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	0	-1
5	0	+1
6	+1	-1
7	+1	0
8	+1	+1
9	0	0
10	0	0
11	0	0

NOTA: variável normalizada-variável experimental =  $z_1$ -[PBO];  $z_2$ -[cúrcuma].

As análises estatísticas e o desenvolvimento de modelos empíricos foram realizados com o auxílio do software Statistica (*Stat Soft Inc*, versão 7). A distribuição de probabilidade normal de erros de medição foi admitida com um nível de confiança de 95% para realizar cálculos estatísticos. A variância das flutuações experimentais foi avaliada com a ajuda das triplicatas realizadas no ponto central e foi considerada como constante em toda a região experimental. Consequentemente, a função objetivo ( $F_{obj}$ ) usada para realizar as estimativas de parâmetros (Equação 1) foi a função de mínimos

quadrados, considerando que o modelo era perfeito e que os experimentos eram realizados de forma independente e estavam sujeitos apenas a erros de medição aleatórios (SCHWAAB; PINTO, 2007; SCHWAAB; PINTO, 2011).

$$F_{\text{obj}} = \sum_{i=1}^{\text{NE}} (y_i^e - y_i^c)^2 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde NE é o número de experimentos,  $y^e$  representa o valor experimental medido e  $y^c$  representa os valores calculados com o modelo proposto.

Os modelos empíricos inicialmente propostos são lineares nos parâmetros descritos na Equação 2, em que  $\alpha_i$  são os parâmetros do modelo,  $z_1$  e  $z_2$  são as variáveis de entrada normalizadas ([PBO] e [C], respectivamente),  $\lambda$  é uma constante de reparametrização (igual a 2/3) para permitir o cálculo dos parâmetros do modelo independente, e  $y$  é a variável de resposta analisada (rendimento – Y ou fluorescência – F) (SCHWAAB; PINTO, 2007; SCHWAAB; PINTO, 2011).

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 z_1 + \alpha_2 z_2 + \alpha_3 z_1 z_2 + \alpha_4 (z_{1,2} - \lambda) + \alpha_5 (z_{2,2} - \lambda) + \alpha_6 (z_{1,2} - \lambda) z_2 + \alpha_7 z_1 (z_{2,2} - \lambda) + \alpha_8 (z_{1,2} - \lambda)(z_{2,2} - \lambda) \quad (\text{Eq. 2})$$

Vale ressaltar que a constante de reparametrização ( $\lambda$ ) foi inserida no modelo para recuperar a ortogonalidade do plano experimental, que é perdida pela inserção de variáveis quadráticas, considerando o modelo sem reparametrização. O cálculo da constante de reparametrização para o modelo exposto, bem como uma análise da ortogonalidade do plano experimental, estão apresentados no Apêndice B.

Os modelos finais consideraram apenas os parâmetros significativos (significância mínima de 0,95) e coeficientes de correlação acima de 0,95, a fim de descrever o sistema satisfatoriamente com o menor número possível de parâmetros.

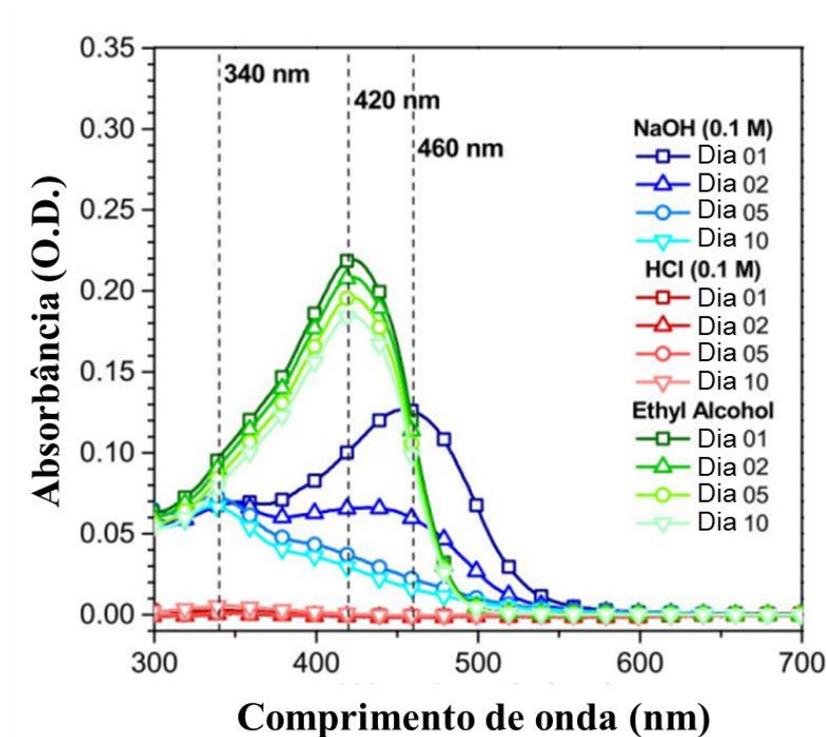
### 3.3 Resultados e discussão

#### 3.3.1 Estabilidade do extrato de cúrcuma em solução

A estabilidade do extrato de cúrcuma, em especial da curcumina que é o componente majoritário, pode ser afetada por vários parâmetros, como a natureza do

solvente, concentração do fluoróforo, exposição à luz, pH do meio e temperatura (KHARAT *et al.*, 2017; TØNNESEN *et al.*, 2002). Tendo em vista que o pH do meio e a natureza do solvente são variáveis críticas para descrever a estabilidade da curcumina em solução, extratos de cúrcuma foram obtidos em diferentes solventes e caracterizados por espectrofotometria (Figura 14) em solução de hidróxido de sódio ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), solução de ácido clorídrico ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) e etanol.

**Figura 14.** Espectro de absorção, ao longo do tempo, da curcumina (presente no extrato de cúrcuma) extraída em diferentes meios (NaOH ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), HCl ( $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ), etanol (99%)).



Nota:  $[cúrcuma]_0 = 1,0 \text{ mg}$  de cúrcuma por  $6,0 \text{ mg}$  de solvente. As medições foram realizadas após filtrar as frações não solúveis de cada amostra. As amostras foram diluídas 10 vezes para medições de absorvância.

Em ambiente ácido (solução aquosa de HCl –  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ ) foi observada discreta banda de absorção com máximo situado em 340 nm. A amostra do extrato de cúrcuma apresentou baixa interação com a solução aquosa ácida, pois sabe-se que a curcumina é pouco solúvel nestas condições (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015). O baixo sinal de absorção observado para a fração solúvel em meio ácido é compatível com a indução de cristalização da curcumina em meio ácido, conforme descrito por KHARAT *et al.* (2017).

Além de extrair uma quantidade insignificante de curcuminoides, vale ressaltar que nenhuma fluorescência foi observada na amostra após excitação em 340 nm, comprimento de onda consistente com os subprodutos da degradação (MONDAL *et al.*, 2016; ZSILA *et al.*, 2003).

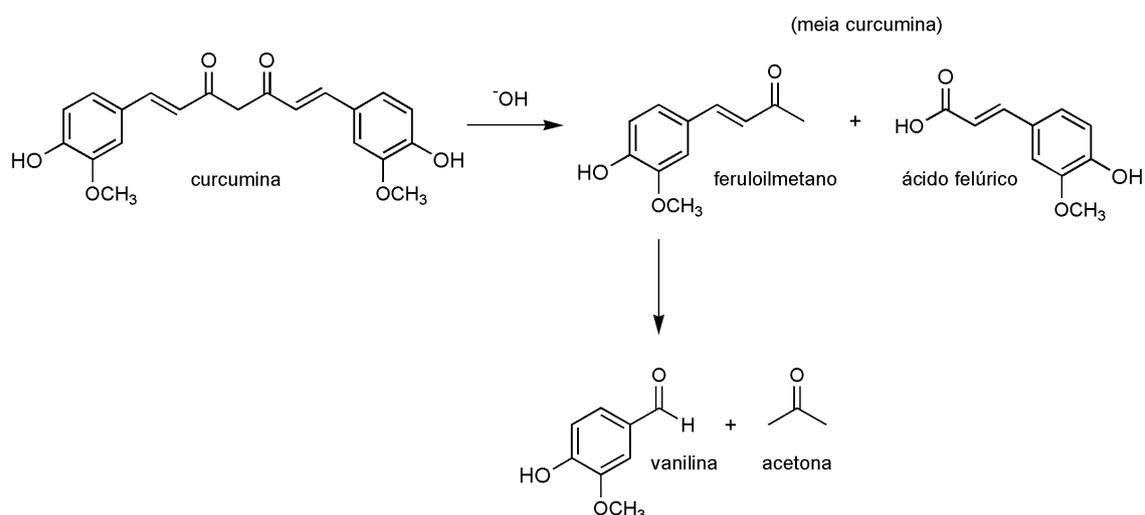
Em meio básico (solução aquosa de NaOH – 0,1 mol L<sup>-1</sup>), o  $\lambda_{\text{max}}$  de absorção foi observado em 460 nm, o que corresponde a um deslocamento de 40 nm em relação ao  $\lambda_{\text{max}}$  absorção do extrato obtido em etanol (420 nm). Este deslocamento pode estar associado às diferentes respostas de desprotonação da curcumina presente no extrato de cúrcuma, que apresenta até cinco espécies que coexistem no equilíbrio ácido-base, resultando em variação de cor do amarelo (em meio ácido) ao vermelho/roxo (em meio alcalino) (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; MONDAL *et al.*, 2016). O efeito batocrômico causado pela remoção de prótons da estrutura molecular, em meio alcalino aumenta a densidade de elétrons na curcumina e, conseqüentemente, a base conjugada passa a atuar como um antioxidante doador de elétrons, pois o grupo enolato formado após a retirada do primeiro próton gera uma espécie carregada negativamente. No entanto, nesta faixa de pH a curcumina pode ser facilmente degradada (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015), como observado pela redução da intensidade da banda em 460 nm ao longo do tempo, enquanto a intensidade da banda em 340 nm foi mantida ( $\lambda$  correspondente ao produto de degradação da curcumina). Como o íon OH<sup>-</sup> ajuda na divisão rápida da cetona nas duas porções ácidas que sofreram degradação adicional, os subprodutos da degradação (primeira e segunda degradação) podem ter contribuído com o sinal de absorção abaixo de 420 nm (MONDAL *et al.*, 2016; ZSILA *et al.*, 2003).

Em etanol, observou-se que o extrato apresentou boa estabilidade, com  $\lambda_{\text{max}}$  de absorção em 420 nm, em que a solução apresentou cor amarela e fluorescência azul (características da curcumina). Observou-se ainda uma leve redução na banda de absorção máxima ao longo do tempo, embora não tenha sido observado o aparecimento expressivo de um subproduto de degradação (MONDAL *et al.*, 2016).

A curcumina (diferuloilmetano) é formada por duas partes simétricas que, quando degradadas, resultam em feruloilmetano e ácido ferúlico (equivalentes a uma meia-curcumina) e podem sofrer fragmentação molecular (produzindo vanilina e acetona), como pode ser observado no Esquema 2. Este processo de degradação é favorecido por meio aquoso e é catalisado por íons OH<sup>-</sup> (MONDAL *et al.*, 2016). O feruloilmetano e o

ácido ferúlico apresentam  $\lambda_{\max}$  de absorção em  $\sim 340$  nm (EtOH), deslocando para aproximadamente 420 nm em misturas de EtOH e KOH, conforme descrito por ZSILA *et al.*, (2003).

**Esquema 2.** Provável mecanismo de degradação da curcumina (favorecido por meio aquoso e catalisado por íons OH<sup>-</sup>).



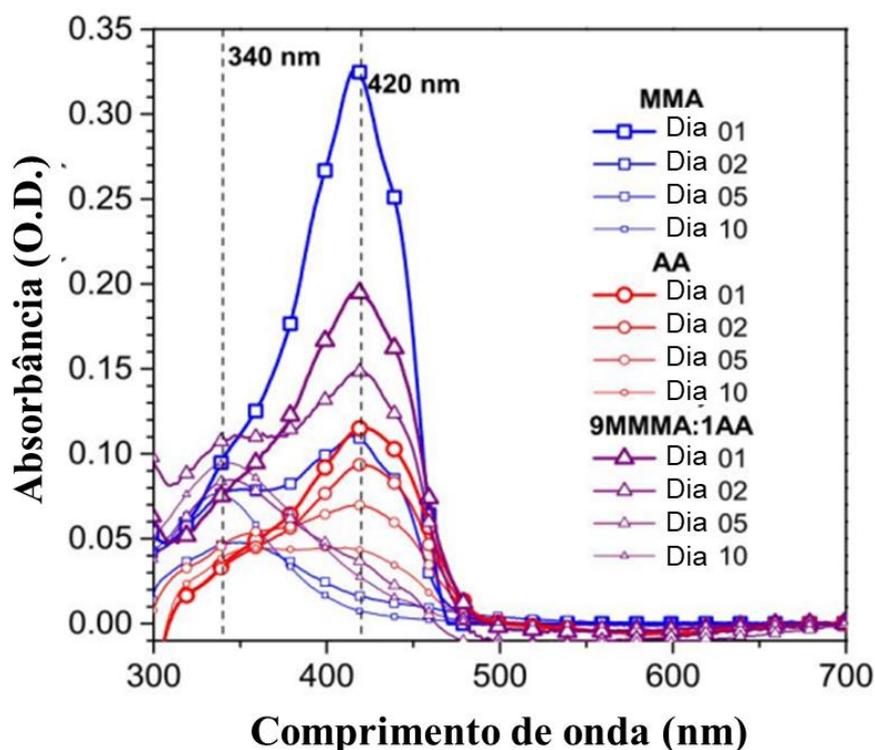
Fonte: Adaptado de ZSILA *et al.*, (2003).

A fim de avaliar a potencial polimerização dos monômeros MMA e AA na presença do extrato de cúrcuma, foram obtidos os espectros de absorção do extrato nesses monômeros. (Figura 15). Em MMA (linhas azuis), foi observado o  $\lambda_{\max}$  de absorção em 420 nm, o mesmo que foi observado para o extrato em etanol. Vale destacar que na presença deste monômero a intensidade de absorção foi maior do que a observada nos outros meios. Isso pode ser um indicativo da boa eficiência da extração da curcumina, embora também possa estar relacionado ao efeito de solvatação da molécula do fluoróforo por diferentes solventes, visto que a interação com o solvente pode afetar a absorção do composto (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; MONDAL *et al.*, 2016). Neste caso, também foi observada a banda referente à degradação da curcumina em  $\sim 340$  nm (acompanhada da redução da intensidade da banda em 420 nm) a partir do segundo dia, o que indica a importância de realizar a polimerização na presença do extrato imediatamente após a realização da extração.

Já na presença do monômero AA (linhas vermelhas), também foi observado o  $\lambda_{\max}$  de absorção em 420 nm. No entanto, a cinética de degradação do fluoróforo em AA foi mais lenta do que a observada em MMA. De fato, a extração do composto ativo em uma

mistura contendo 10% em peso de AA e 90% em peso de MMA (linhas roxas) permitiu o aumento significativo da estabilidade da curcumina, caracterizada pelo processo muito mais lento de redução da intensidade da banda em 420 nm. A descoloração mais lenta da solução na presença de AA se deve provavelmente ao aumento da acidez do meio promovido pelo comonômero, corroborando a estabilidade proporcionada pelos meios ácidos aos curcuminoides (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

**Figura 15.** Espectro de absorção ao longo do tempo da cúrcuma extraída em monômeros (100% MMA, 100% ácido acrílico AA e 90% MMA:10% AA).

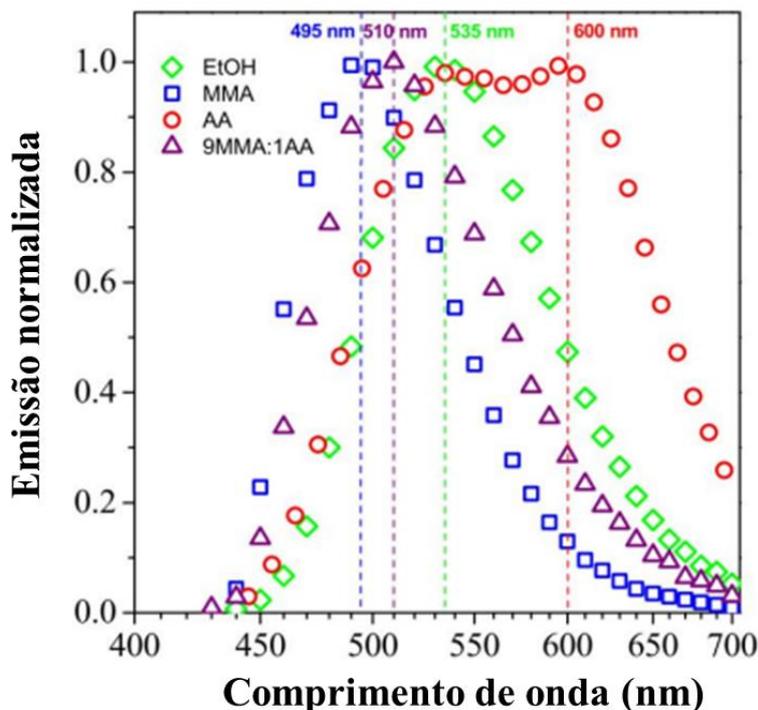


Nota: [cúrcuma]<sub>0</sub> = 1,0 mg de cúrcuma por 6,0 mg de solvente. As medições foram realizadas após a filtragem das frações não solúveis de cada amostra. As amostras foram diluídas 10 vezes para medições de absorção.

A Figura 16 apresenta o espectro de emissão do extrato de cúrcuma obtido em etanol e nos monômeros. Utilizando como referência o espectro de emissão do extrato de cúrcuma em etanol, em que o  $\lambda_{em}$  máximo é por volta de 535 nm, foi observado um efeito hipsocrômico (deslocamento para o azul) para o extrato em MMA ( $\lambda_{em} = 495$  nm) e um efeito batocrômico (deslocamento para o vermelho) para o extrato em AA ( $\lambda_{em} = 600$  nm). A adição de 10% em peso de AA ao extrato obtido primariamente em MMA resultou em um leve deslocamento para a região do vermelho do espectro eletromagnético

(9MMA:1AA,  $\lambda_{em} = 510$  nm), corroborando a indução do efeito batocrômico promovido pelo AA (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015).

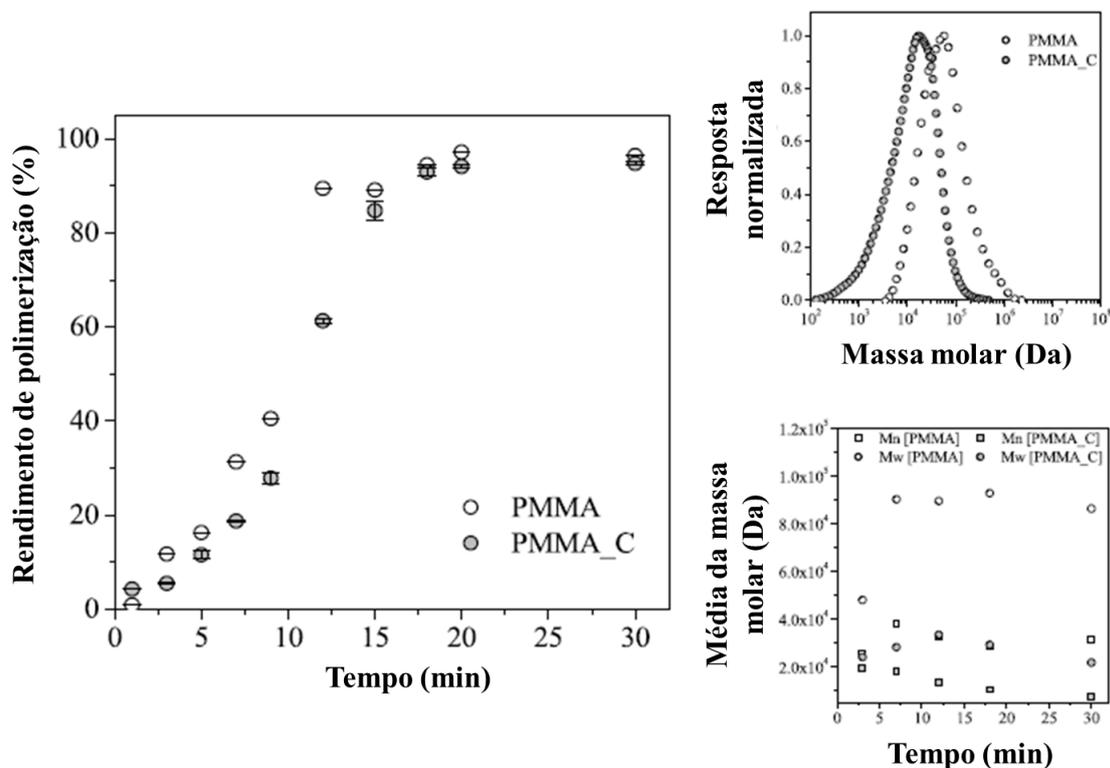
**Figura 16.** Comparação dos espectros de emissão ( $\lambda_{ex} = 420$  nm) do extrato de cúrcuma obtido em etanol e nos monômeros (MMA, AA e 9MMA:1AA).



### 3.3.2 Cinética de polimerização na presença de extrato de cúrcuma

O efeito do extrato de cúrcuma na cinética das polimerizações em massa foi avaliado apenas no monômero MMA (PMMA\_C). A Figura 17 mostra os rendimentos obtidos com o monômero MMA e o extrato de cúrcuma no monômero. É possível observar que a presença da curcumina no meio reacional retarda a cinética de polimerização do MMA (diminuição da taxa média de polimerização de 4,9 para 3,7 em  $\%/min^{-1}$ ). Este efeito retardador pode ser atribuído à ampla conjugação eletrônica presente na estrutura da curcumina que possibilita a interação com os radicais livres da cadeia polimérica em crescimento (SUETH-SANTIAGO *et al.*, 2015; VERROS *et al.*, 2011). Além disso, a redução das taxas de reação foi acompanhada pela redução das massas molares médias do produto obtido na presença do fluoróforo.

**Figura 17.** Trajetórias dinâmicas dos rendimentos de polimerização e massas molares médias (aos 30 min de reação) dos polímeros (PMMA e PMMA\_C).



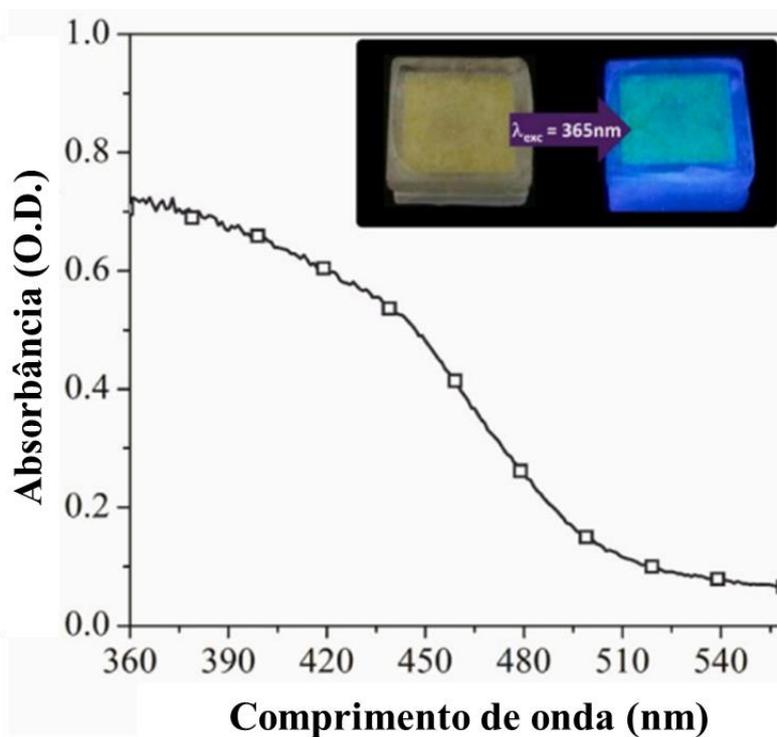
Nota: Reação realizada a 80 °C e contendo 0,5% em peso de cúrcuma em relação ao monômero.

Ambos os efeitos observados simultaneamente na presença de extrato de cúrcuma sugerem que este composto natural atua como um retardador de polimerização, devido à possível redução de reações de propagação e às interações entre radicais livres em crescimento e a curcumina (COSTA *et al.*, 2019; MISHRA; DASWAL, 2005). Deve ser considerado que, teoricamente, a curcumina pode atuar como um agente de transferência de cadeia, agente de terminação ou mesmo como um comonômero, devido à formação de um radical fenóxi. No entanto, do ponto de vista prático, é muito importante observar que a adição de extrato de cúrcuma à carga inicial de monômero MMA não impediu a ocorrência das reações de polimerização, permitindo a preparação, com altos rendimentos, de materiais poliméricos com massas molares médias suficientemente grandes, possibilitando a execução da incorporação *in situ* do extrato de cúrcuma em materiais à base de PMMA.

### 3.3.3 Fotoestabilidade em estado sólido do polímero fluorescente

O polímero fluorescente obtido com o extrato de cúrcuma por polimerização em massa de MMA foi caracterizado quanto à fotoestabilidade, pela exposição do polímero fluorescente à luz ultravioleta (UVA) e à luz branca (LED), como descrito no item 3.2.6. Estudos de fotoestabilidade de amostras de polímeros de PMMA realizados na região UV (248, 193 e 157 nm) (BEAUVOIS *et al.*, 1997; SHANTI *et al.*, 2017) mostraram o aumento na clivagem de cadeias poliméricas com o aumento do tempo de irradiação. Neste trabalho, os comprimentos de onda utilizados para o estudo da degradação foram incluídos na região de absorção da curcumina (Figura 18), a fim de avaliar a fluorescência da biomolécula, ao invés de induzir a clivagem do polímero. A ampla banda de absorção no estado sólido observada para o polímero contendo curcumina (banda posicionada na faixa de 360 a 500 nm) é consistente com a observada para a curcumina pura no estado sólido, como mostrado por LI *et al.* (2021).

**Figura 18.** Espectro de absorção no estado sólido do PMMA\_C e imagem do polímero emitindo luz após irradiação por lâmpada UV ( $\lambda = 365$  nm).

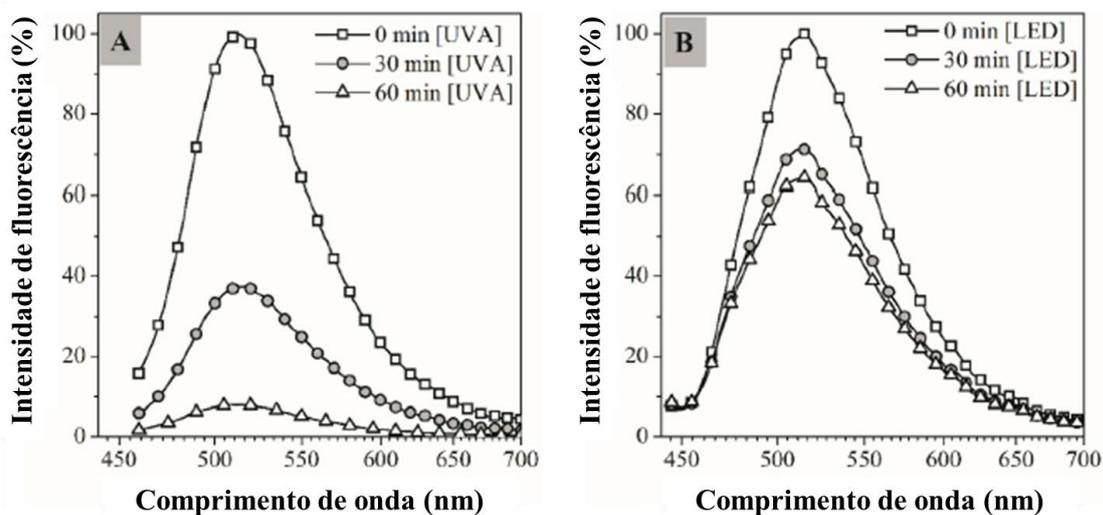


O polímero modificado com curcumina, quando exposto às condições ambiente, não apresentou alteração perceptível de cor. Assim, o aumento da fotoestabilidade da molécula (comparado ao comportamento em solução) foi analisado em um teste de

exposição à luz em condições severas. O primeiro estudo (Figura 19-A) foi feito na região UVA (315-380 nm) e foi observada a supressão de 60% da intensidade da fluorescência após 30 min de irradiação. O segundo estudo foi feito com a lâmpada LED branca (Figura 19-B) e a supressão da intensidade de fluorescência após 30 min de exposição foi menor (30%) porque a lâmpada LED emite comprimentos de onda menos energéticos na região visível (de 400 nm).

Mesmo sendo observada uma supressão da intensidade de fluorescência ao expor o polímero à luz UVA e ao LED, ficou claro o aumento da fotoestabilidade da curcumina quando incorporada a uma matriz polimérica, quando comparada ao comportamento do fluoróforo em solução orgânica. Além disso, embora a incorporação do polímero pareça proporcionar maior estabilidade à curcumina, ela ainda sofre degradação quando exposta à radiação visível (LED), mas em menor extensão do que a observada quando exposta à radiação UVA (MISHRA; DASWAL, 2005).

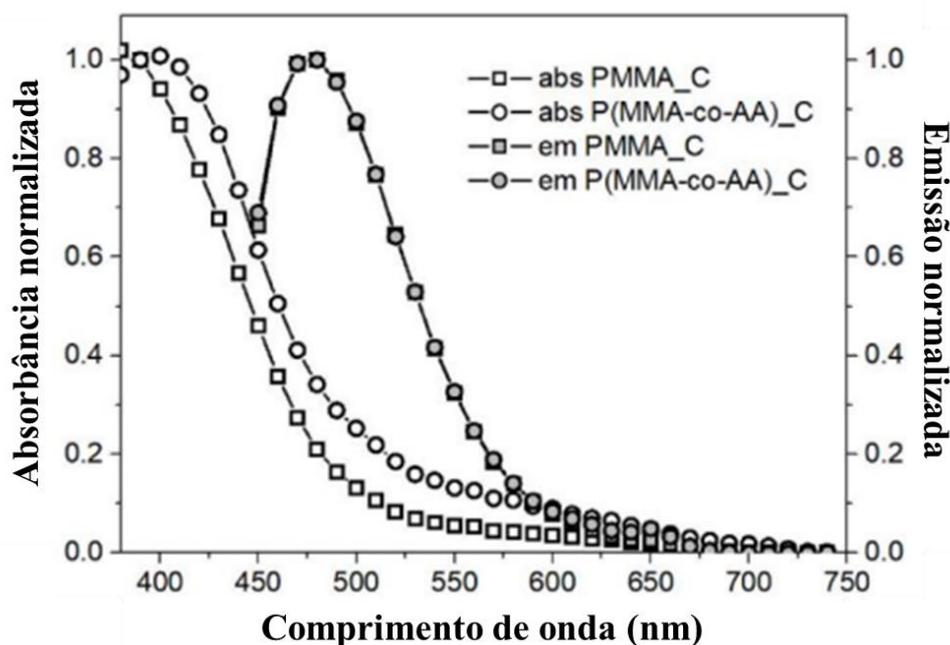
**Figura 19.** Espectro de emissão no estado sólido ( $\lambda_{ex} = 410 \text{ nm}$ ) do PMMA\_C após irradiação a 25 °C usando (A) lâmpada UVA (315–380 nm) e (B) LED branco.



O comportamento da fluorescência das amostras de homopolímero (PMMA\_C) e copolímero (P(MMA-co-AA)\_C) foi avaliado quanto aos perfis de absorção e emissão (Figura 20). Os polímeros foram solubilizados em THF e precipitados por evaporação do solvente na forma de filmes finos, para melhorar a qualidade da medição em estado sólido. Foi possível observar um desvio para a região do vermelho no espectro de absorção da matriz P(MMA-co-AA)\_C quando comparado com a amostra PMMA\_C,

embora este desvio não tenha sido observado no espectro de emissão. Isso se deve à estabilização do estado excitado da curcumina na presença da matriz mais polar, P(MMA-co-AA), ser mais eficiente do que na matriz menos polar.

**Figura 20.** Espectro de absorção e emissão no estado sólido dos filmes finos de PMMA\_C e P(MMA-co-AA)\_C. O espectro de emissão foi obtido sob excitação no comprimento de onda de máxima absorção ( $\lambda_{ex} = 410$  nm).

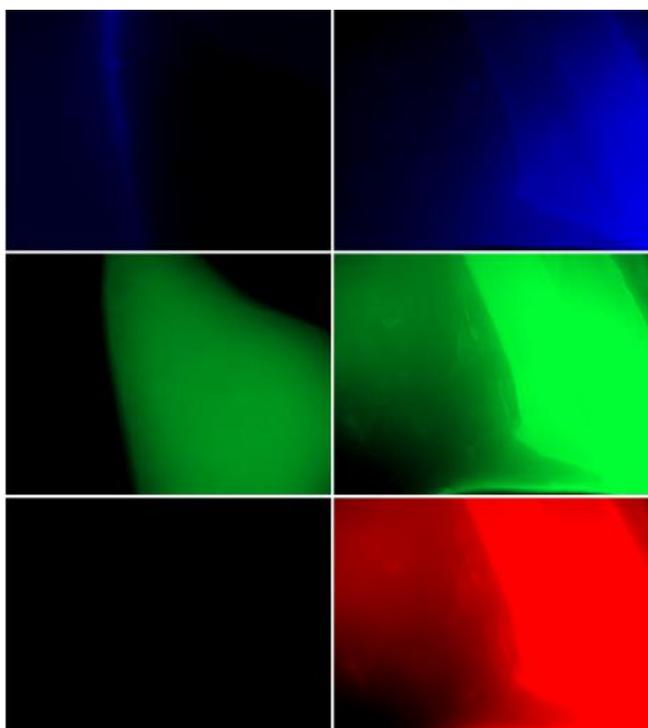


A presença de grupos polares na curcumina pode resultar em vários tipos de interações com a matriz polimérica, causando deslocamentos espectrais ou uma diminuição na energia de transição ( $S_0-S_1$ ), sendo esse efeito potencializado na presença de uma matriz polimérica mais polar (DE FRANÇA *et al.*, 2022). O comportamento da fluorescência de ambas as amostras na fluorescência de microscopia óptica (Figura 21) mostrou fluorescência na faixa azul, refletindo o efeito da matriz polimérica, e na faixa verde, característica da curcumina, sendo mais intensa na amostra do copolímero.

O copolímero P(MMA-co-AA)\_C também apresentou fluorescência na faixa do vermelho, o que não foi observado no caso do homopolímero. Este fato corrobora o aumento da estabilidade fotoquímica atribuída ao composto ativo na presença do ácido acrílico como monômero precursor mais polar (conforme também mostrado na Seção 3.3.2). Além disso, é coerente observar a fluorescência vermelha na amostra do copolímero P(MMA-co-AA) sem observar tal fluorescência na amostra do homopolímero

PMMA\_C, submetida à mesma condição de excitação na fluorescência de microscopia óptica, dada a diferença no perfil de absorção nestas amostras (Figura 20).

**Figura 21.** Imagens das amostras PMMA\_C (esquerda) e P(MMA-co-AA)\_C (direita) obtidas em microscópio de fluorescência invertido.



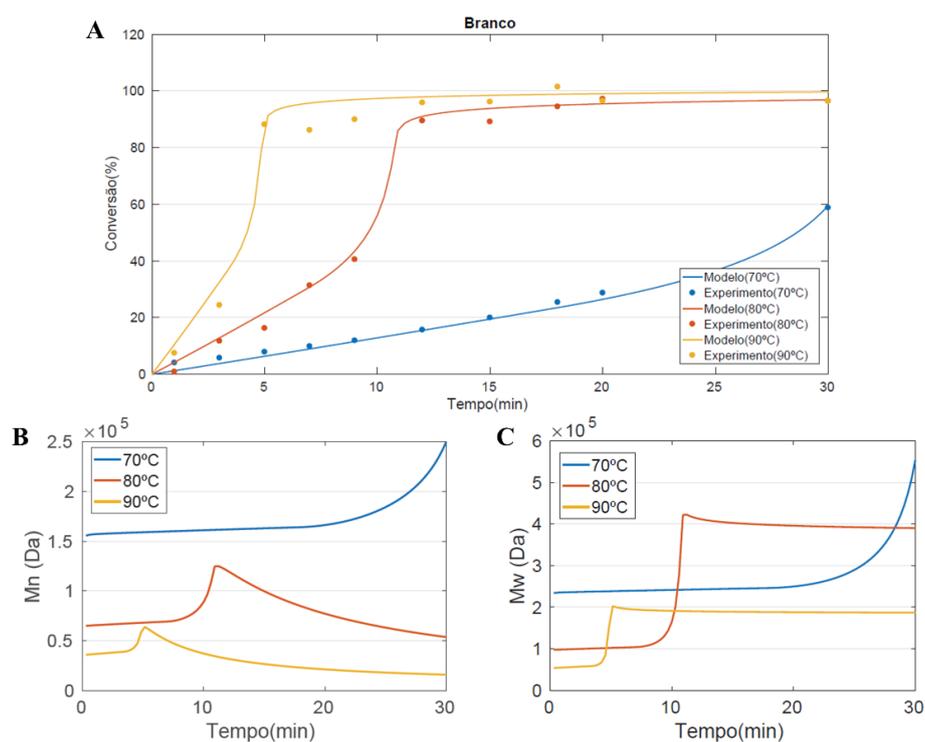
Nota: Exposições de cerca de 200 ms, na faixa azul ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ ), verde ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) e vermelho ( $\lambda_{\text{ex}} = 594 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ ).

Considerando que a excitação ocorreu na região de 594 nm (Figura 21), pode ser observado na Figura 20 que nesta região o copolímero apresentou absorvância significativamente maior que o homopolímero, o que explica uma emissão mais intensa em vermelho para o copolímero. Porém, para o homopolímero nessa mesma região, a absorvância é muito baixa (quase zero) e, dessa forma, uma menor quantidade de fótons é excitada nesta região. A confirmação da fluorescência das amostras poliméricas modificadas com extrato de cúrcuma em um amplo espectro de emissão (azul, verde e vermelho) indica o uso potencial do material para futuras aplicações como marcadores biológicos em escala nanométrica (DA ROCHA *et al.*, 2019; SANTOS *et al.*, 2021; MOGHARBEL *et al.*, 2018).

### 3.3.4 Modelagem fenomenológica da polimerização em massa do sistema MMA na presença de extrato de cúrcuma

Os experimentos de polimerização em massa do MMA sem a cúrcuma (branco) foram realizados em diferentes temperaturas (70 °C, 80 °C e 90 °C), com o objetivo de avaliar se as constantes cinéticas retiradas da literatura representam bem os dados experimentais. Esses resultados estão apresentados na Figura 22 e validam as constantes e o modelo proposto. O grau de concordância entre as conversões obtidas pelo modelo e os dados experimentais pode ser considerado satisfatório. Verifica-se ainda que as massas molares médias obtidas pelo modelo estão coerentes com o encontrado na literatura ( $M_w$  aproximadamente igual a  $4 \times 10^5$ ) (TEFERA *et al.*, 1997).

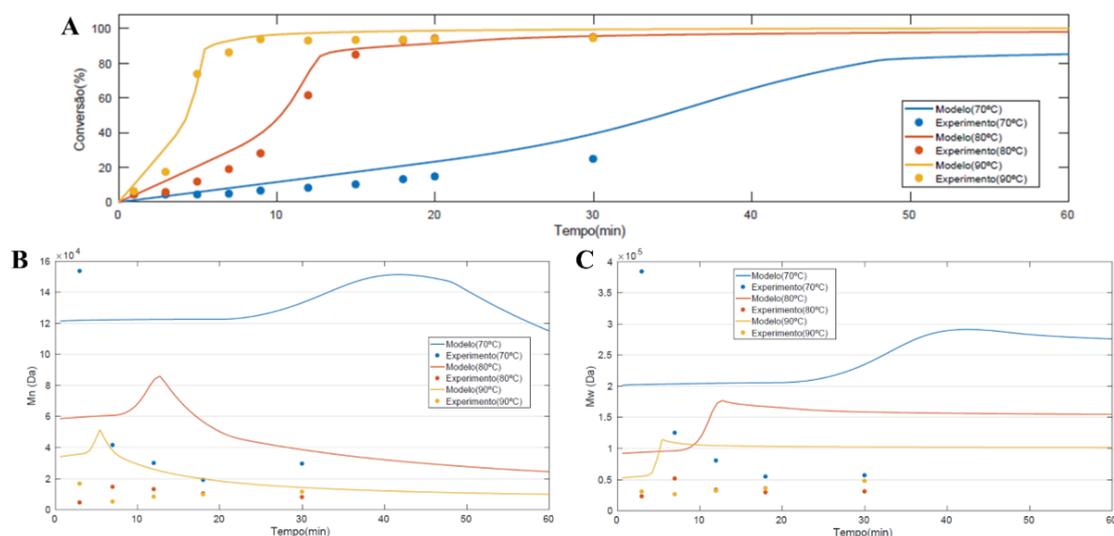
**Figura 22.** Resultados obtidos com o modelo proposto. A- Comparação entre os dados de conversão previstos e os dados experimentais do branco. B/C- perfis temporais de massas molares médias.



Tendo em vista o bom desempenho do modelo proposto para as condições experimentais do branco, o mesmo foi utilizado para descrever o efeito da cúrcuma na polimerização em massa do MMA. Como já foi comentado anteriormente, a cúrcuma foi incluída no modelo cinético como agentes de terminação e de transferência de cadeia. Os resultados de conversão e massas molares médias obtidos após a estimação são

apresentados na Figura 23.

**Figura 23.** Comparação entre os dados experimentais na presença do extrato de cúrcuma e os valores previstos pelo modelo proposto. A- Conversão e B/C- perfis temporais de massas molares médias.



Verifica-se que as curvas de conversão obtidas pelo modelo se adequam aos dados experimentais, mostrando o bom desempenho do modelo. É possível observar também que a presença da cúrcuma no meio reacional retarda a polimerização do MMA. Isso se deve principalmente à presença dos diversos grupos funcionais hidroxila, bem como às insaturações presentes na molécula do fluoróforo, que podem interferir na cinética de polimerização.

Entretanto, quando se observam as massas molares, o ajuste satisfatório não acontece. O modelo difere significativamente dos dados experimentais, indicado que a cúrcuma não atua apenas como um agente clássico de transferência e terminação de cadeia. Sendo assim, uma abordagem que deve ser avaliada é a possibilidade de a cúrcuma atuar como comonômero na polimerização do MMA ou de exercer algum outro efeito relevante sobre o efeito gel da reação de MMA, caracteristicamente intenso nessa reação (FLANDERS; GRAMLICH, 2022). Observou-se em particular que as massas molares médias foram muito menores que as previstas com os modelos, mas que não seguiram trajetórias igualmente crescentes (resultante de efeito gel ou consumo preferencial da curcumina) ou decrescente (resultante do acúmulo relativo de curcumina) com o tempo nas diferentes temperaturas, reforçando a ideia de que múltiplos efeitos

competitivos podem atuar no sistema estudado.

### 3.3.5 Modelagem empírica da polimerização em massa do sistema (MMA-co-AA) em presença de extrato de cúrcuma

O delineamento experimental foi realizado com base no copolímero P(MMA-co-AA)\_C, uma vez que foi observado o aumento da estabilidade da curcumina na presença de AA na matriz polimérica nas seções anteriores. As amostras resultantes do planejamento experimental foram caracterizadas quanto ao rendimento de polimerização (C) e fluorescência (F) das amostras finais (30 min de reação). Para cada variável de saída, um modelo matemático empírico foi desenvolvido. Todas as amostras apresentaram fluorescência, tanto no estado sólido quanto solubilizadas em solvente orgânico. No entanto, as medições para o desenho experimental foram feitas solubilizando o polímero em um solvente orgânico, para garantir a confiabilidade quantitativa das medições. A Tabela 8 apresenta o conjunto completo de experimentos do planejamento fatorial realizado e descreve os valores de rendimentos ( $C_{10}$ ), absorção ( $A_{\max} = 410 \text{ nm}$ ) e emissão ( $F_{\max} = 500 \text{ nm}$ ).

**Tabela 8.** Variáveis de entrada normalizadas e respectivas variáveis de saída para os experimentos correspondentes ao planejamento experimental proposto.

Experimento	$z_1$	$z_2$	$C_{10}$ (% p/p)	$A_{\max}$	$F_{\max}$ (fótons $\times 10^5$ )
1	-1	-1	77,29	0,068	0,475
2	-1	0	69,61	0,243	1,950
3	-1	+1	69,93	0,444	2,706
4	0	-1	90,42	0,056	0,355
5	0	+1	78,84	0,357	2,270
6	+1	-1	95,62	0,053	0,276
7	+1	0	95,25	0,177	0,910
8	+1	+1	85,55	0,332	1,529
9	0	0	78,88	0,186	0,887
10	0	0	79,11	0,177	1,015
11	0	0	79,87	0,197	1,273

NOTA: variável normalizada-variável experimental =  $z_1$ -[PBO];  $z_2$ -[cúrcuma].

As medições de rendimento ( $C_{10}$ ) usadas para avaliação estatística dos dados foram as conversões de monômeros obtidas após 10 minutos de reação. Este tempo de reação foi selecionado para ampliar os possíveis efeitos da taxa de reação, pois todas as conversões foram semelhantes e próximas de 100% após 30 min de reação. Por outro lado, as medidas de absorvância ( $A_{\max}$ ) e fluorescência ( $F_{\max}$ ) foram relativas às amostras obtidas após 30 min de reação, para representar o material polimérico final. Os resultados referentes às medições completas (todos os pontos experimentais), de todas as amostras que compuseram o delineamento experimental são apresentados no Anexo A.

As variâncias das medidas foram avaliadas com as réplicas obtidas no ponto central, conforme indicado na Tabela 9. Ressalta-se que as variâncias das variáveis  $C_{10}$  e  $A_{\max}$  foram consideravelmente pequenas, enquanto a variância relacionada à caracterização da fluorescência ( $F_{\max}$ ) foi maior. Em todos os casos, no entanto, as medições foram estatisticamente significativas e as variações observadas foram muito maiores do que as flutuações das medições, permitindo análises estatísticas sólidas dos dados. Como foi observado que as variáveis  $A_{\max}$  e  $F_{\max}$  estão fortemente correlacionadas (a intensidade de fluorescência é proporcional à intensidade da absorvância, com coeficiente de correlação igual a 0,95), deste ponto em diante será adotada a absorvância como medida indireta da fluorescência, visando a reduzir a propagação de erros na implementação do modelo empírico e permitir uma análise estatística mais consistente.

**Tabela 9.** Análise estatística dos erros nos pontos centrais.

	$C_{10}$	$A_{\max}$	$F_{\max}$
Média	79,29	0,187	1,058
Desvio Padrão	0,52	0,010	0,197
Variância	0,27	0,0001	0,039
Erro* (%)	1,31	10,70	37,24

\*Admitindo o erro experimental como o dobro dos desvios padrões (consideradas distribuições normais de probabilidade com 95 % de confiança).

As correlações entre as variáveis de entrada e saída do planejamento experimental proposto estão representadas na matriz de correlações (Tabela 10), em que as correlações significativas estão apresentadas em vermelho. A variável  $F_{\max}$  foi incluída na análise,

confirmando a alta correlação entre as medidas de absorvância e emissão de fluorescência (coeficiente de correlação 0,95 – destaque em amarelo).

**Tabela 10.** Matriz de correlações entre variáveis de entrada e saída do Planejamento Experimental.

	<b>z<sub>1</sub></b>	<b>z<sub>2</sub></b>	<b>C<sub>10</sub></b>	<b>A<sub>máx</sub></b>	<b>F<sub>máx</sub></b>
<b>z<sub>1</sub></b>	1,00	0,00	0,86	-0,19	-0,39
<b>z<sub>2</sub></b>	0,00	1,00	-0,42	0,96	0,87
<b>C<sub>10</sub></b>	0,86	-0,42	1,00	-0,55	-0,68
<b>A<sub>máx</sub></b>	-0,19	0,96	-0,55	1,00	0,95
<b>F<sub>máx</sub></b>	-0,39	0,87	-0,68	0,95	1,00

NOTA: variável normalizada-variável experimental = z<sub>1</sub>-[PBO]; z<sub>2</sub>-[cúrcuma].

Os valores estatisticamente significativos estão representados em vermelho.

A matriz de correlações também indica a existência de correlação significativa da conversão com o teor de iniciador e da absorvância (assim como fluorescência) com o teor de extrato de cúrcuma. Ambas as correlações (destacadas em verde) são diretamente proporcionais e serão discutidos na apresentação dos modelos matemáticos a seguir.

Vale ressaltar que a interação entre as variáveis de entrada resulta em uma matriz identidade (destacada em cinza), devido à ortogonalidade do plano fatorial completo proposto (SCHWAAB; PINTO, 2007; SCHWAAB; PINTO, 2011). Os valores normalizados das variáveis de entrada (z<sub>1</sub> e z<sub>2</sub>) e os valores correspondentes das variáveis de saída (C<sub>10</sub> e A<sub>máx</sub>), conforme apresentados na Tabela 10, foram alimentados no *software* Statistica para construção de modelos estatísticos empíricos, no formato apresentado na Equação 2 (Seção 3.2.8). Os modelos finais obtidos (Equações 3 e 4) apresentam apenas parâmetros significativos, expressos com seus respectivos erros paramétricos.

$$C_{10} = 82,36 \pm 0,43 + 9,93 \pm 0,56[PBO] - 4,84 \pm 0,56[cúrcuma] - 4,33 \pm 1,18([cúrcuma]^2 - 2/3) - 6,26 \pm 1,56([PBO]^2 - 2/3) ([cúrcuma]^2 - 2/3) \text{ (Eq. 3)}$$

$$A_{máx} = 0,21 \pm 0,003 - 0,03 \pm 0,004[PBO] + 0,16 \pm 0,004[cúrcuma] - 0,0 \pm 0,005[PBO][cúrcuma] + 0,02 \pm 0,006([PBO]^2 - 2/3) + 0,02 \pm 0,006([cúrcuma]^2 - 2/3) \text{ (Eq. 4)}$$

Os modelos de conversão e absorvância forneceram valores de função objetivo de 11,15 e 6,07 e coeficientes de correlação de 0,993 e 0,996, respectivamente, indicando o bom ajuste fornecido pelos parâmetros do modelo. As análises detalhadas dos ajustes do modelo empírico são apresentadas no Anexo B.

Analisando a Equação 3, pode-se notar que os rendimentos de polimerização em massa das reações P(MMA-co-AA) realizadas na presença de extrato de cúrcuma foram afetados tanto pelo iniciador quanto pela carga de fluoróforo, embora a concentração do iniciador exerça a maior parte do efeito, conforme esperado (e descrito pelo respectivo valor do parâmetro). Além disso, o modelo apresenta natureza não linear, conforme descrito pelas magnitudes dos termos quadráticos e da superfície de resposta apresentada na Figura 24.

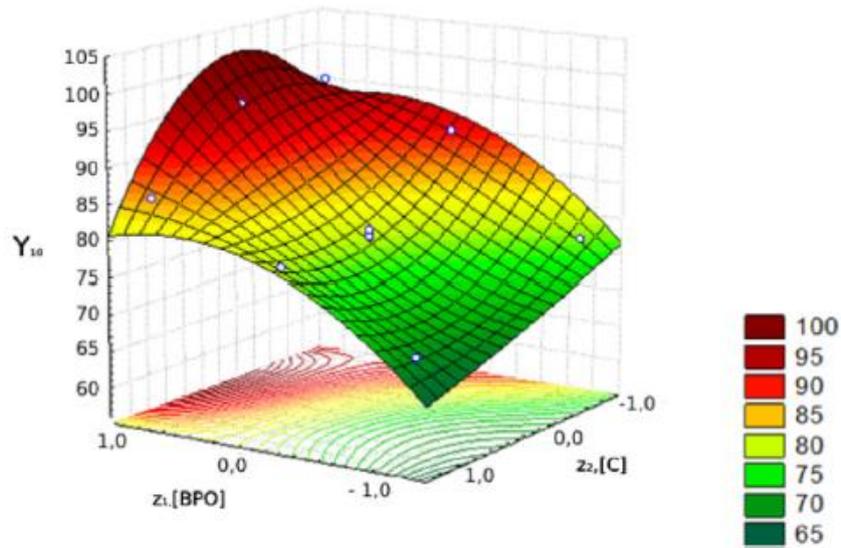
Com base nos valores dos parâmetros, pode-se perceber que a carga do iniciador afeta positivamente a conversão, enquanto o teor do extrato de cúrcuma afeta os valores de conversão negativamente, conforme esperado e descrito anteriormente. De acordo com a Equação 4, pode-se notar que a absorvância (em medida direta de fluorescência) é afetada principalmente linearmente pela carga de fluoróforo, como também mostrado na Figura 25.

O efeito PBO é pequeno e negativo, possivelmente devido à interação dos radicais livres gerados com os curcuminoides, que podem prejudicar a atividade fotoquímica dos compostos fotoativos. Com base nas Equações 3 e 4 e nas Figura 24 e Figura 25, parece evidente que as respostas não lineares são mais fortes para o modelo de conversão do que para a fluorescência. No entanto, a identificação das condições ideais de reação não é óbvia, pois a maior carga de cúrcuma melhora as respostas de fluorescência, mas reduz os rendimentos. Comportamento oposto pode ser observado para a carga do iniciador. Assim, para definir a melhor condição de reação (alta fluorescência e alto rendimento simultaneamente), as linhas de contorno de ambos os modelos foram sobrepostas, conforme mostrado na Figura 26.

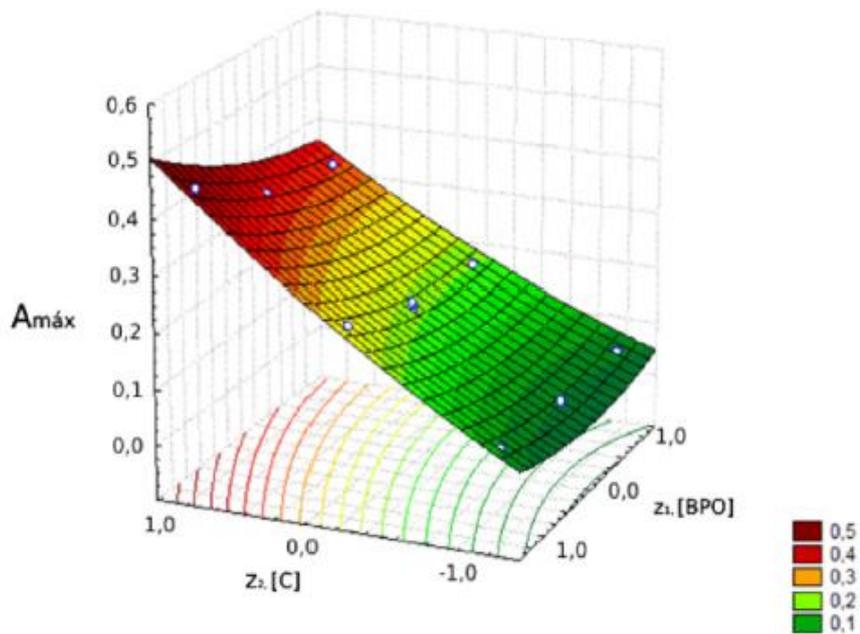
É possível constatar que o melhor conjunto de condições de reação está concentrado no quadrante que combina cargas mais altas de iniciador e extrato de cúrcuma na faixa analisada. De fato, dado o efeito relativamente fraco do PBO na fluorescência, parece natural maximizar o conteúdo de curcumina para aumentar a resposta da fluorescência. Por outro lado, o efeito negativo da curcumina nos rendimentos

obtidos pode ser parcialmente ou totalmente compensado pelo uso de maiores quantidades de PBO ou simplesmente aumentando o tempo de reação, o que pode levar a conversão final do monômero a valores muito próximos de 100%. em cerca de 30 min em todos os casos analisados.

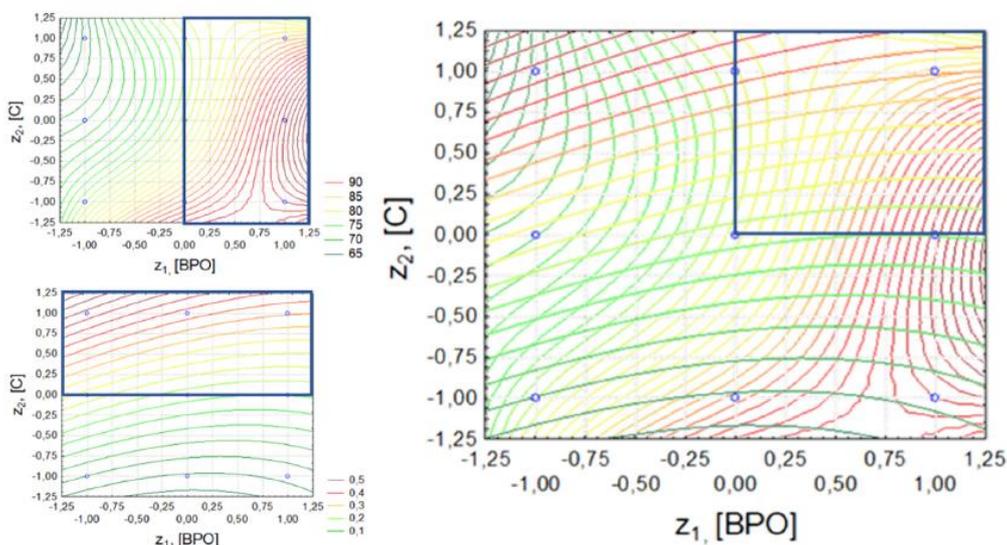
**Figura 24.** Superfície de resposta para conversão da polimerização ( $C_{10}$ ).



**Figura 25.** Superfície de resposta para fluorescência ( $A_{\max}$ ).



**Figura 26.** Otimização das condições de reação por meio da superposição de superfícies de resposta para rendimento e fluorescência.



### 3.4 Conclusões

A estabilidade do extrato de cúrcuma foi avaliada em diferentes solventes e monômeros e em diferentes condições, para entender a influência do solvente na estabilidade da curcumina. Além disso, reações de polimerização em massa de metacrilato de metila (MMA) e ácido acrílico (AA) foram realizadas na presença do extrato de cúrcuma, a fim de avaliar os efeitos da curcumina no comportamento cinético da reação e eficiência de incorporação final. Os resultados mostraram que é possível incorporar cúrcuma em matrizes poliméricas de PMMA e P(MMA-co-AA) *in situ* e que este processo mantém as propriedades fluorescentes do material. De fato, observou-se aumento da estabilidade fotoquímica da molécula natural quando esta foi incorporada à matriz polimérica, quando comparada à estabilidade observada em solução. Com a ajuda de um planejamento fatorial completo a três níveis, foi possível otimizar as condições reacionais. O incremento em conversão e fluorescência é favorecido pelo teor do iniciador e carga de cúrcuma próximas de 3% em peso e 0,5% em peso, respectivamente.

A confirmação das propriedades fluorescentes dos polímeros à base de PMMA modificados com extrato de cúrcuma em um amplo espectro de emissão (azul, verde e vermelho) viabiliza o potencial uso desses materiais como marcadores biológicos. Neste contexto, o encapsulamento de cúrcuma em nanopartículas poliméricas pode constituir

uma alternativa viável para o emprego desta biomolécula em terapias oncológicas, contornando as limitações de biodisponibilidade apresentadas pela biomolécula e prolongando sua atividade no organismo. Este *design* nanoestruturado será avaliado no Capítulo V.

### **3.5 Cooperações técnicas e produções científicas**

#### **3.5.1 Colaborações**

O presente Capítulo foi desenvolvido com as seguintes colaborações:

- 1) **Juliana Goulart** – Doutora do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ/IQ/UFRJ): ensaios fotoquímicos de caracterização do extrato de cúrcuma em diferentes meios e dos polímeros fluorescente, bem como ensaio de degradação fotoquímica.
- 2) **Tahyná Fontoura e Thamiris Paiva** - Doutoradas do Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ): desenvolvimento e implementação da modelagem polimérica fenomenológica.

#### **3.5.2 Orientações**

O presente Capítulo desdobrou nas seguintes orientações/supervisões:

- 1) **Cláudio Abreu** – Mestrando do Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ), realizou os ensaios correlatos ao planejamento experimental e modelagem empírica em projeto desenvolvido, sob minha supervisão, na disciplina “Estimação de Parâmetros e Projeto de Experimentos”, em 2018.
- 2) **Beatriz Silva** – Mestranda do Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ), está desenvolvendo dissertação intitulada “Produção de filme polimérico contendo curcumina visando teranóstico tumoral: desenvolvimento de sensores diagnóstico e sonda para terapia fotodinâmica”, sob orientação da professora Helen da Conceição Ferraz e minha colaboração (previsão de defesa mestrado: 2024.1).

#### **3.5.3 Produções científicas**

Este capítulo resultou na apresentação dos seguintes trabalhos em congresso:

- 1) Obtenção de polímero fluorescente e otimização do desempenho do material compósito, apresentado na modalidade pôster no **II Simpósio Nacional de Nanobiotecnologia (SNNB 2018)**.
- 2) Desenvolvimento de material polimérico fluorescente baseado em extrato de cúrcuma: uma visão cinética e fotoquímica, apresentado na modalidade oral no **15º Congresso Brasileiro de Polímeros (CBPol 2019)**.

Este capítulo, também, resultou na publicação do seguinte artigo:

- 1) *Development of a fluorescent PMMA-based polymer material through in-situ incorporation of curcuma extract*. Martins G. M. *et al.*, Volume 273, 24 April 2023, 125870, Polymers. (<https://doi.org/10.1016/j.polymer.2023.125870>). 4.96 IF (2023).

# 4 CAPÍTULO IV

## Desenvolvimento de Nanopartículas Magnéticas com Modificação de Superfície

Todos os dias quando acordo  
Não tenho mais o tempo que  
passou  
Mas tenho muito tempo  
Temos todo o tempo do  
mundo

Todos os dias antes de  
dormir  
Lembro e esqueço como foi  
o dia  
Sempre em frente  
Não temos tempo a perder

Nosso suor sagrado  
É bem mais belo que esse  
sangue amargo

E tão sério

E selvagem  
Selvagem  
Selvagem

Veja o sol dessa manhã tão  
cinza

A tempestade que chega é da  
cor dos teus olhos  
Castanhos

Então me abraça forte  
Me diz mais uma vez que já  
estamos  
Distantes de tudo

Temos nosso próprio tempo  
Temos nosso próprio tempo  
Temos nosso próprio tempo

Não tenho medo do escuro  
Mas deixe as luzes  
Acesas agora

O que foi escondido  
É o que se escondeu  
E o que foi prometido  
Ninguém prometeu  
Nem foi tempo perdido

Somos tão jovens  
Tão jovens  
Tão jovens

Tempo Perdido (Renato Russo)

## 4.1 Contextualização

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) são as mais utilizadas para marcação e rastreamento de células, já que a depuração renal dessas partículas é mais lenta, o sinal de ressonância magnética é mais forte (quando comparado aos de outros agentes de contraste magnéticos), o custo de produção é baixo, a estabilidade físico-química é alta, a biocompatibilidade é boa, além da natureza ser não tóxica e biodegradável (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

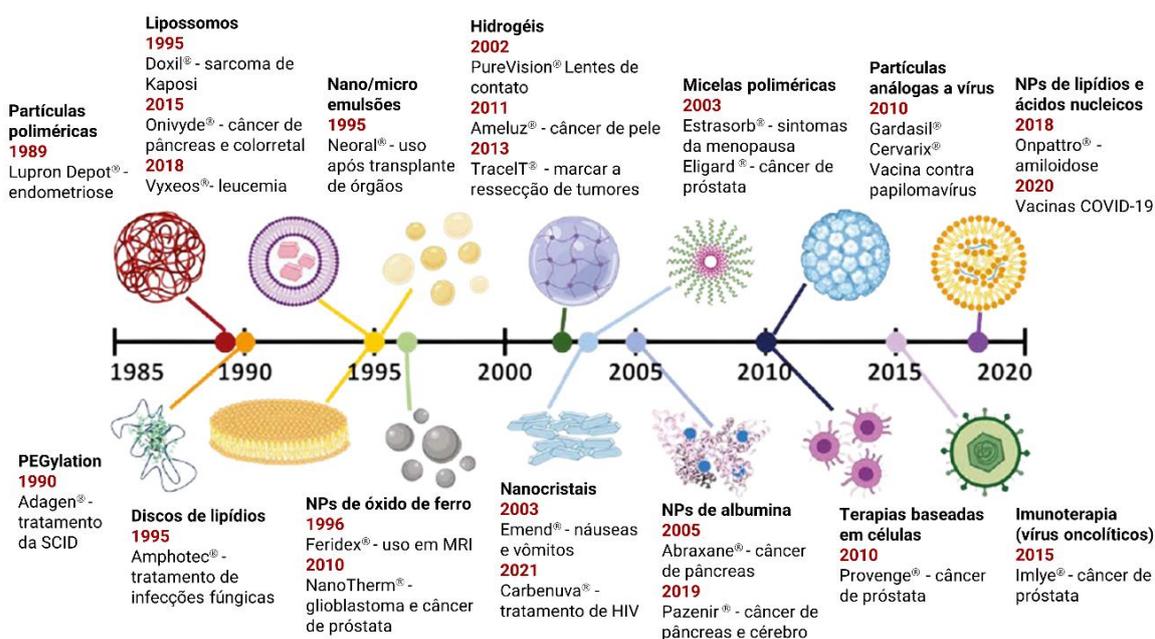
A associação de nanopartículas com polímeros agrega uma série de vantagens a aplicações médicas destes materiais. Além de aumentar a estabilidade das partículas em solução, o polímero incrementa a estabilidade oxidativa do material magnético (KUMAR; MOHAMMAD, 2011; WU, W. *et al.*, 2015). Adicionalmente, a adição do polímero na superfície das nanopartículas magnéticas favorece a dispersão individual das partículas em fluidos biológicos e aumenta o tempo de circulação das nanopartículas no organismo. Além disso, o recobrimento polimérico permite agregar funcionalidades por intermédio do recobrimento ou conjugação à superfície de agentes terapêuticos, agentes de direcionamento e intensificadores de permeação celular (BOYER *et al.*, 2010).

Atualmente não existem nanopartículas aprovadas para uso humano especificamente produzidas para o rastreamento celular, embora existam nanopartículas magnéticas aprovadas para o diagnóstico ou a terapia e que podem ser alternativamente utilizadas no rastreamento celular. BATTY *et al.*, (2021) e RODRÍGUEZ *et al.* (2022) compilaram alguns exemplos de nanopartículas aprovadas para uso clínico em diferentes tipos de tratamentos pelos órgãos reguladores *Food and Drug Administration* (FDA) e/ou *European Medicines Agency* (EMA), como esquematizado na Figura 27.

Para a implementação de novas propostas e novos produtos de terapia celular avançada, são necessários ensaios clínicos que demonstrem a ausência de efeitos adversos e presença de efeitos terapêuticos desejados, inicialmente realizados nas fases I e II. Informações sobre a distribuição das células transplantadas, tanto temporal quanto espacial, são fundamentais para compreender os efeitos dessas novas terapias. Respostas para questões bastante discutidas atualmente, como se a melhora do quadro se deve a ação direta das células nos tecidos lesados ou através da ação indireta pela produção de fatores bioativos de forma sistêmica, podem ser obtidas pelo uso de técnicas de rastreamento

celular *in vivo*. O rastreamento das células também responde questões sobre o tempo de vida e sobre a melhor via de administração das células (ROGERS; MEYER; KRAMER, 2006). Para que se possa rastrear as células, é necessário marcá-las por técnicas que permitam sua posterior identificação *in vivo*. Dessa forma, nanopartículas têm sido vastamente exploradas com esse objetivo.

**Figura 27.** Linha do tempo com alguns exemplos de nanopartículas aprovadas para uso clínico pelo FDA e/ou EMA para diferentes tipos de tratamentos.



Fonte: Adaptado de BATTY *et al.*, (2021) e RODRÍGUEZ *et al.* (2022).

Comparando as técnicas de rastreamento celular disponíveis atualmente, a marcação com nanopartículas magnéticas apresenta a maior disponibilidade e aplicabilidade em estudos clínicos. O uso de nanopartículas magnéticas para o rastreamento por imagens de RMN (MRI, do inglês *Magnetic Resonance Imaging*) apresenta alta resolução espacial, usa materiais biocompatíveis e possui a vantagem de que dados funcionais podem ser coletados simultaneamente com os dados de rastreamento. Uma das maiores desvantagens da técnica é a baixa sensibilidade, quando comparada aos marcadores fluorescentes ou radioativos.

As nanopartículas fluorescentes também podem ser utilizadas para o rastreamento, podendo ser visualizadas por sistema *in vivo* de imageamento (IVIS, do inglês *in vivo imaging system*) que apresenta baixo custo, quando comparado aos equipamentos

utilizados nas outras técnicas. Entretanto, esta técnica não pode ser aplicada clinicamente, pois a luz fluorescente tem baixa capacidade de penetração na superfície do corpo, estando o uso limitado a pequenos animais. Já os marcadores radioativos possuem um tempo de meio-vida curto, em geral de horas, o que limita muito o rastreamento a médio e longo prazos, além do breve tempo disponível para o transporte, pois eles são produzidos por equipamentos específicos, como aceleradores de partículas ou reatores nucleares (JASMIN *et al.*, 2017).

Algumas SPIONs foram produzidas e disponibilizadas comercialmente para uso humano para diagnóstico ou terapia, como as nanopartículas Feridex<sup>®</sup>/Endorem<sup>®</sup> (120–180 nm de diâmetro, *AMAG Pharmaceuticals/Guerbet*), que foram produzidas para detecção de tumor no fígado. As nanopartículas Combidex<sup>®</sup>/Sinerem<sup>®</sup> (15–30 nm, *AMAG Pharmaceuticals/Guerbet*) estão aprovadas para diagnóstico de tumor em linfonodos, porém foram descontinuados. O Resorvist<sup>®</sup> (45–60 nm, *Bayer Schering*) possibilita a detecção de tumor de fígado e o Supravist<sup>®</sup> (21 nm, *Bayer Schering*) é utilizado para angiografia, sendo que o Resorvist foi descontinuado. Excepcionalmente, o Feraheme<sup>®</sup> (30 nm, *AMAG Pharmaceutical*) não é utilizado para diagnóstico, mas sim como suplemento no tratamento de anemias.

A descontinuação da produção das nanopartículas tem afetado os estudos sobre rastreamento celular, pois muitos trabalhos que foram publicados investigaram a marcação de células com materiais que não estão mais disponíveis comercialmente. É importante pontuar que a descontinuação tem ocorrido principalmente por fatores econômicos. Algumas empresas têm comercializado nanopartículas não aprovadas clinicamente para estudos pré-clínicos; entretanto, não está claro se há a intenção de uma futura aprovação clínica. Isso mostra uma clara lacuna para o desenvolvimento de novas nanopartículas específicas para marcação e rastreamento celular, que além de serem utilizadas em estudos pré-clínicos possam futuramente ser refinadas e testadas para uso clínico.

Nanopartículas com dupla função, magnética e fluorescente, podem ser de grande interesse, principalmente em estudos pré-clínicos e em pesquisa básica, em que é possível realizar uma caracterização rápida e de menor custo baseada no componente fluorescente, tanto quanto estudos mais detalhados sobre a distribuição espacial das células a partir do componente magnético. Assim, no presente estudo foram desenvolvidas nanopartículas

magnéticas-fluorescentes para uso na marcação e rastreamento de células-tronco a curto prazo e teranóstico tumoral a longo prazo, com o foco em garantir a eficiência e segurança das mesmas para tais aplicações.

## 4.2 Materiais e métodos

### 4.2.1 Especificação dos insumos

**Sínteses:** Os reagentes sulfato ferroso heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , reagente ACS, pureza  $\geq 99,0\%$ ), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , teor máximo de água de 5 % p/p), ferro metálico pulverizado ( $\text{Fe}^0$ , pureza  $\geq 99,5\%$ ), cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , grau PA, pureza  $\geq 97,0\%$ ), cloreto férrico hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , grau PA, pureza  $\geq 97,0\%$ ), solução de amônia ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , grau Emsure ACS e teor de 28-30 % p/v em água), (3-aminopropil)trimetoxisilano (APTMS,  $\text{H}_2\text{N}(\text{CH}_2)_3\text{Si}(\text{OCH}_3)_3$ , pureza  $\geq 97\%$ ) e a rodamina B isotilcianato NCS são provenientes da *Merck* (Alemanha). Os reagentes foram empregados sem purificação prévia, com exceção do sulfato ferroso, que foi recristalizado após redução em presença de ferro metálico em meio ácido.

**Ensaio biológico:** meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) alta glicose, soro fetal bovino (SFB), antibióticos penicilina-estreptomicina (PS), brometo de metiltiazolil-difenil-tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), paraformaldeído (PFA), *Triton*<sup>®</sup> X- 100, solução salina tamponada com fosfato (PBS), albumina de soro bovino (BSA) foram adquiridos da *MERCK* (Alemanha). O ar sintético com 5% de  $\text{CO}_2$  foi adquirido da White Martins (Brasil).

### 4.2.2 Síntese de nanopartículas superparamagnéticas (SPION-NPM)

A síntese de nanopartículas magnéticas de magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) foi realizada pelo método de coprecipitação (BEDÊ *et al.*, 2017) a partir da reação equimolar dos precursores  $\text{FeCl}_3$  ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) e  $\text{FeCl}_2$  ( $0,5 \text{ mol.L}^{-1}$ ) em meio básico, com etapa prévia de purificação de sulfato de ferro II e posterior conversão de cloreto de ferro II ( $\text{FeCl}_2$ ) *in situ*. A reação foi conduzida em um reator encamisado de vidro (borossilicato), sob aquecimento a 60 °C e agitação mecânica de 1000 rpm. O pH do meio reacional foi alterado com a adição de 25,0 mL de amônia ( $\text{NH}_4\text{OH}$  28-30% p/v), resultando em um pH na faixa de 9 – 10. A adição da base proporciona instantaneamente a formação de um

precipitado preto, indicando a formação do óxido magnético. A mistura reacional obtida foi mantida sob agitação por 30 min nas condições já citadas após adição da base. A suspensão final foi resfriada até a temperatura ambiente e a fase sólida foi sedimentada com o auxílio de um ímã. O precipitado foi lavado com água deionizada até pH neutro. A amostra final de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro foi armazenada em água sob refrigeração de 3 – 5 °C. Uma alíquota foi seca ao ar, seguido de secagem a vácuo a 60 °C, para posterior funcionalização e caracterização físico-química.

#### **4.2.3 Funcionalização dos SPIONs com aminosilano (NPM-NH<sub>2</sub>)**

A etapa de funcionalização foi conduzida em uma solução contendo etanol: água na proporção 98:2 (v/v), em que foram ressuspensas 0,5% p/v de nanopartículas magnéticas. Um ultrassom de ponteira (Marca *Hielscher*, Modelo UP100H, Alemanha) foi utilizado por 5 minutos para auxiliar na ressuspensão das nanopartículas magnéticas. Após o sistema atingir 60 °C, adicionou-se inicialmente 2,0 mL de APTMS e, em seguida, mais 3,0 mL foram adicionados em intervalos de 1 h (divididos em adição de 1,0 mL cada) totalizando 5,0 mL. Após a última adição, o sistema permaneceu sob agitação mecânica e aquecimento *overnight*. As partículas foram lavadas com álcool etílico e água destilada na proporção 70:30 (v/v), decantadas com ímã e o sobrenadante descartado, repetindo-se o procedimento três vezes. Por fim, as amostras lavadas foram secas e armazenadas. As nanopartículas preparadas e funcionalizadas com aminosilano foram nomeadas como NPM-NH<sub>2</sub>.

#### **4.2.4 Conjugação de rodamina isotilcianato (NCS) em SPIONs (NPM-NH<sub>2</sub>\_Rod)**

O fluoróforo rodamina-B (Rod-B) foi ancorado à superfície das NPM-NH<sub>2</sub>, visando ao rastreamento por fluorescência. A rodamina é um fluoróforo pertencente à família dos xantenos, assim como a fluoresceína, os quais vêm sendo muito utilizados na Biologia por sua excelente fotoestabilidade e por apresentarem propriedades fotofísicas adequadas à aplicação em sistemas biológicos, como solubilidade em água. Para conjugação, primeiramente foram preparados 5 mL de solução aquosa 0,2 mg/mL de Rod-B. Em um tubo de vidro, pesaram-se 15,0 mg de EDC (carbodiimida) e posteriormente adicionou-se 1,0 mL da solução de Rod-B previamente preparada, ajustando-se o pH para 4-5. A solução foi então mantida sob agitação por 1 h. Foram em seguida ressuspensas 10,0 mg de NPM-NH<sub>2</sub> em 1,0 mL de solução NaOH (10<sup>-5</sup> M) pH 7-9. Após 1 h de agitação, adicionou-se a solução de Rod-B com EDC às NPM-NH<sub>2</sub>

ressuspendidas em NaOH. O sistema foi mantido estático por 1 h a 8 °C. Posteriormente, o sobrenadante foi removido e, para acelerar a decantação das NPM, foi utilizado um ímã. Então, as amostras foram lavadas com água deionizada. As nanopartículas magnéticas contendo rodamina conjugada à superfície foram nomeadas como NPM-NH<sub>2</sub>\_Rod e armazenadas ressuspendidas em água, em frascos revestidos com papel alumínio para a proteção do fluoróforo contra a luz.

#### 4.2.5 Caracterizações físico-químicas

As amostras obtidas (NPM pura/funcionalizada), foram caracterizadas quanto ao diâmetro hidrodinâmico (DLS – espalhamento de luz), potencial zeta, difração de raios X (DRX), espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), microscopia eletrônica de transmissão (MET), magnetometria de amostra vibrante (VSM) e hipertermia magnética (perfil de liberação de calor).

##### 4.2.5.1 Potencial zeta e diâmetro hidrodinâmico

O potencial zeta ( $\zeta$ ) e o diâmetro hidrodinâmico ( $\phi_H$ ) das nanopartículas foram determinados no equipamento da *Malvern R*, modelo *Nano-ZS*, Reino Unido. O equipamento opera com laser de comprimento de onda 632,8 nm e ângulo de espalhamento de 173°. Para as análises de DLS, as NPMs foram ressuspendidas em água ultrapura, meio de cultura com e sem soro fetal bovino (SFB) e dispersas com auxílio de ultrassom (sonicador), em que permaneceu por 5 minutos. As análises de potencial zeta ( $\zeta$ ) foram realizadas em diferentes valores de pH para a obtenção da curva de potencial zeta e o ponto isoelétrico, utilizando soluções de ácido clorídrico (HCl) e hidróxido de sódio (NaOH) para ajuste de pH.

##### 4.2.5.2 Difração de raios X

As amostras de nanopartículas magnéticas foram caracterizadas quanto a estrutura cristalina por difração de raios X, possibilitando a estimativa do diâmetro do cristalito, empregando a equação de Scherrer (Equação 5). Os difratogramas de raios X foram obtidos em difratômetro de pó *Bruker*, modelo *D8 Advanced*, Alemanha. Foi utilizada fonte de radiação CuK $\alpha$ , com fenda de 0,6 mm e filtro PSD-Ni, para realizar medidas com passo de 0,05° e tempo de leitura por ponto de 0,2 s.

$$\bar{d} = k\lambda / \beta \cos(\theta) \text{ (Eq. 5)}$$

Onde  $\bar{d}$  é o diâmetro médio do cristalino;  $k$  é o fator de Scherrer (0,94);  $\lambda$  é o comprimento de onda da radiação eletromagnética ( $K\alpha_{\text{cobre}} = 1,54 \text{ \AA}$ );  $\beta$  é a largura à meia altura do pico de maior intensidade e  $\theta$  é o ângulo de difração para o pico de maior intensidade.

#### **4.2.5.3 Microscopia eletrônica de transmissão**

As micrografias foram obtidas no microscópio eletrônico de transmissão de alta resolução *JEOL*, modelo *2100F*, Japão. A voltagem de aceleração foi igual a 200 kV e foi utilizado um sistema de espectroscopia por dispersão de energia de raios-X (EDS) *Thermo Scientific*, modelo *Noran System 7*, EUA. As amostras foram ressuspendidas em álcool etílico, dispersadas em banho de ultrassom por 15 minutos a temperatura ambiente e dispostas em grades de cobre recobertas com carbono e resina polimérica. A distribuição de tamanho de partícula foi obtida a partir de imagens da análise de MET, medindo o diâmetro de cerca de 200 partículas usando o *software ImageJ*.

#### **4.2.5.4 Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier**

Os espectros dos nanossistemas foram gerados em uma faixa de comprimento de onda de 400 a 4000  $\text{cm}^{-1}$ , com um espectrofotômetro de infravermelho *PerkinElmer*, modelo *Spectrum Two*, EUA, com resolução de 4  $\text{cm}^{-1}$ . As amostras foram previamente secas, misturadas em KBr, prensadas para obtenção de pastilhas e então submetidas a análise.

#### **4.2.5.5 Magnetometria de amostra vibrante**

Medidas de magnetização foram realizadas no aparelho *Physical Property Measurement System* (PPMS) da *Quantum Design*, modelo *DynaCool*, EUA, utilizando a opção *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM). As medidas foram realizadas sob campo variável de 30.000 a -30.000 Oe, em temperatura fixa de 300 K.

#### **4.2.5.6 Hipertermia magnética**

Medidas de hipertermia magnética foram realizadas, utilizando um sistema de indução da *Ambrell*, modelo *Easy Heat EH 3542 LI*, Reino Unido. Um frasco de vidro contendo 1,0 mL de uma dispersão aquosa de 10,0  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  da amostra foi posicionado em um calorímetro com isolamento térmico. A suspensão foi exposta a um campo

magnético alternado com frequência ( $f$ ) de 224 kHz, amplitude (H) de 275 Oe por 15 min e acionado por uma bobina, gerando um campo magnético alternado induzido, enquanto um termômetro de fibra óptica mede a mudança de temperatura. A eficiência de aquecimento da amostra sob um campo magnético alternado (AMF) foi quantificada usando a taxa de absorção específica (SAR, *specific absorption rate*) (Equação 6) e com valores normalizados em relação aos seus parâmetros extrínsecos, para obter perda de potência específica (ILP, *intrinsic loss power*) (Equação 7), como amplitude e frequência de campo,

$$SAR [W \cdot g^{-1}] = \left[ c_p [J \cdot g^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}] + \frac{c_{H_2O} [J \cdot g^{-1} \cdot ^\circ C^{-1}] \times \rho_{H_2O} [mg \cdot mL^{-1}]}{m_p [mg \cdot mL^{-1}]} \right] \times \frac{dT}{dt} [^\circ C \cdot s^{-1}] \quad (Eq. 6)$$

$$ILP [nH \cdot m^2 \cdot kg^{-1}] = \frac{SAR [W \cdot kg^{-1}]}{f [kHz] \cdot H^2 [kAm^2]} \quad (Eq. 7)$$

Onde  $c_p$  é o calor específico da partícula magnética ( $c_{p(\text{magnetita})} = 0,670 \text{ J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $c_{H_2O}$  é o calor específico da água ( $c_{H_2O(\text{meio de suspensão})} = 4,187 \text{ J g}^{-1} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$ ),  $\rho_{H_2O}$  é a massa específica da água ( $\rho_{H_2O} = 1,0 \text{ g mL}^{-1}$ ),  $m_p$  é a concentração de massa de partículas no meio de suspensão,  $dT/dt$  é a inclinação do gráfico temperatura versus tempo (2 a 3 minutos),  $f$  é a frequência do campo magnético alternado e  $H$  é a amplitude deste campo.

#### 4.2.6 Ensaios biológicos

Foram realizados ensaios com diferentes tipos celulares, como células tronco, fibroblastos (BalbC) e células tumorais de pulmão (A549). Ensaios preliminares foram realizados em células tronco (células não diferenciadas), evoluindo para uma análise em células saudáveis de mamíferos (fibroblastos, célula do tecido conjuntivo) e células tumorais de mamíferos (células tumorais de pulmão). Os ensaios biológicos realizados contemplaram viabilidade e internalização celular. Os procedimentos realizados são detalhados a seguir.

##### 4.2.6.1 Cultivo de células

Foram isoladas células tronco mesenquimais no Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa UFRJ (NUMPEX-BIO/UFRJ Xerém), conforme as normas estabelecidas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Após o estabelecimento de uma linhagem de cultivo para a obtenção de uma cultura enriquecida em células mesenquimais, células na

terceira passagem foram cedidas para realização deste estudo. As células mesenquimais foram cultivadas em DMEM-F12, suplementado com 10% de soro fetal bovino, enquanto as células de fibroblasto (BalbC) e as células tumorais (A549) foram cultivadas em meio de cultivo DMEM high glicose suplementado com 10 % de soro fetal bovino. As células foram mantidas em ambiente úmido a 37 °C com 5 % de CO<sub>2</sub> e cada experimento foi realizado na curva de crescimento celular exponencial.

#### **4.2.6.2 Exposição das células às nanopartículas**

Os ensaios de exposição foram realizados com três diferentes linhagens celulares para validar de forma abrangente as aplicações possíveis das NPMs. Todas as células foram plaqueadas durante 24 horas em uma densidade celular de  $26 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup>. Para o ensaio de rastreamento celular foram utilizadas células mesenquimais de mamífero. As células foram expostas a dose de nanopartículas de 1,5; 2,5 e 4,5 µg/mL ressuspensas em meio de cultivo DMEM-F12 suplementado com 10% de soro fetal bovino durante 1 h, 3 h e 4 h.

Para os ensaios de citotoxicidade sem aplicação de campo magnético, foram usadas células saudáveis do tecido conjuntivo de camundongo (fibroblasto, BalbC) e células de tumor pulmonar humano (A549). As células foram expostas às nanopartículas ressuspensas em DMEM *high glicose* suplementado com 10% de soro fetal bovino. As concentrações de exposição foram de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 e 1000 µg/mL por um tempo de 24 horas.

#### **4.2.6.3 Interação celular com as nanopartículas**

A reação de azul da Prússia foi utilizada para visualizar o óxido de ferro por microscopia de luz convencional, de acordo com a metodologia desenvolvida por (JASMIN *et al.*, 2011). As células cultivadas em lamínulas de vidro foram fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min. Para isso o material foi incubado com a solução de *Perls* (contendo 20 % de ferrocianeto de potássio e 20 % de ácido clorídrico) por 20 min à temperatura ambiente. A contra-coloração foi realizada por marcação de eosina. Os núcleos foram corados com 1% de *Nuclear Fast Red* durante 5 minutos. Em seguida, as células foram gradualmente desidratadas com diluições seriadas de álcool, e posteriormente lavadas com xilol e montadas em meio de montagem. As imagens foram adquiridas no microscópio óptico invertido *Olympus*, modelo *CKX41*, Japão.

#### **4.2.6.4 Confirmação de internalização por microscopia de fluorescência**

Para visualização das partículas na microscopia de epifluorescência, foram empregadas as nanopartículas com rodamina conjugada. As células plaqueadas em lamínulas foram expostas às nanopartículas fluorescentes nas condições indicadas previamente, fixadas com paraformaldeído 4% por 30 min, coradas com marcação nuclear (DAPI), e as lamínulas foram montadas em meio de montagem *Vectashield*. As imagens foram capturadas usando microscópio invertido *Zeiss* (modelo *AXIO observer A*, Alemanha) do Laboratório de Células do Centro Brasileiro de Pesquisas Físicas (CBPF), usando luz laser com comprimento de onda de excitação de 350 nm para o DAPI (emissão em 380 nm) e de 546 nm para a rodamina (emissão em 568 nm).

#### **4.2.6.5 Hipertermia magnética em modelo celular 2D**

Para realização dos ensaios de hipertermia, foi selecionada a concentração de material de 100 µg/mL e as células tumorais pulmonares A549. Após 24 h de exposição, um campo magnético de corrente alternada de 15,5 KA m<sup>-1</sup> e frequência de 307 KHz foi aplicado em um único ciclo por 50 minutos ou alternativamente por 5 ciclos cumulativos de 30 minutos cada, aplicados uma vez por dia durante 5 dias. Entre os ciclos, as células eram retornadas para a estufa com fluxo de CO<sub>2</sub> e temperatura e umidade controlados.

#### **4.2.6.6 Viabilidade celular (ensaio MTT)**

Para avaliar a viabilidade celular após a exposição às diferentes concentrações de nanomaterial, foi realizado o ensaio de MTT (*3-(4,5-dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*). O controle positivo de morte celular foi induzido com a exposição a dimetilsulfóxido (DMSO) 1%. As células foram expostas a uma concentração de MTT de 5 mg/mL durante 4 h. Em seguida, o meio contendo MTT foi retirado e os cristais de formazan dissolvidos em 100 µL de DMSO por poço. A leitura de absorvância foi realizada em comprimento de onda de 570 nm e 690 nm. Os valores de absorvância em 570 nm foram subtraídos aos valores de absorvância em 690 nm (que representa o branco do fundo da placa). Todos os resultados foram mostrados como % vs o controle negativo (células vivas sem tratamento).

#### **4.2.6.7 Viabilidade celular (*Presto Blue*)**

O ensaio de *Presto blue* (kit disponível comercialmente) foi realizado por incubação das células tumorais pulmonares A549 durante 10 minutos com a solução de *Presto Blue* na concentração de 44  $\mu\text{M}$  e exposição de 100  $\mu\text{g/mL}$  de nanopartículas, com campo magnético alternado aplicado em 5 ciclos repetidos.

#### **4.2.6.8 Citotoxicidade (*Live and dead*)**

O teste de citotoxicidade por fluorescência live/dead foi realizado incubando as células após exposição aos materiais. Como controle positivo de morte, as células foram expostas a uma solução de SDS 1%, 30 minutos antes da realização do teste. Para realização do teste *live/dead*, as células foram incubadas por 30 minutos com uma solução contendo calceína AM em uma concentração final de 2  $\mu\text{M}$  e 4  $\mu\text{M}$ , respectivamente, lavadas e visualizadas no microscópio invertido *Zeiss* (modelo *AXIO observer A*, Alemanha), do Laboratório de Células do CBPF, usando luz laser no comprimento de onda  $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$  para calceína AM ( $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) e  $\lambda_{\text{ex}} = 546 \text{ nm}$  para PI ( $\lambda_{\text{em}} = 568 \text{ nm}$ ). Foram consideradas vivas as células em verde (marcação em calceína AM) e mortas as células em vermelho (marcação com PI).

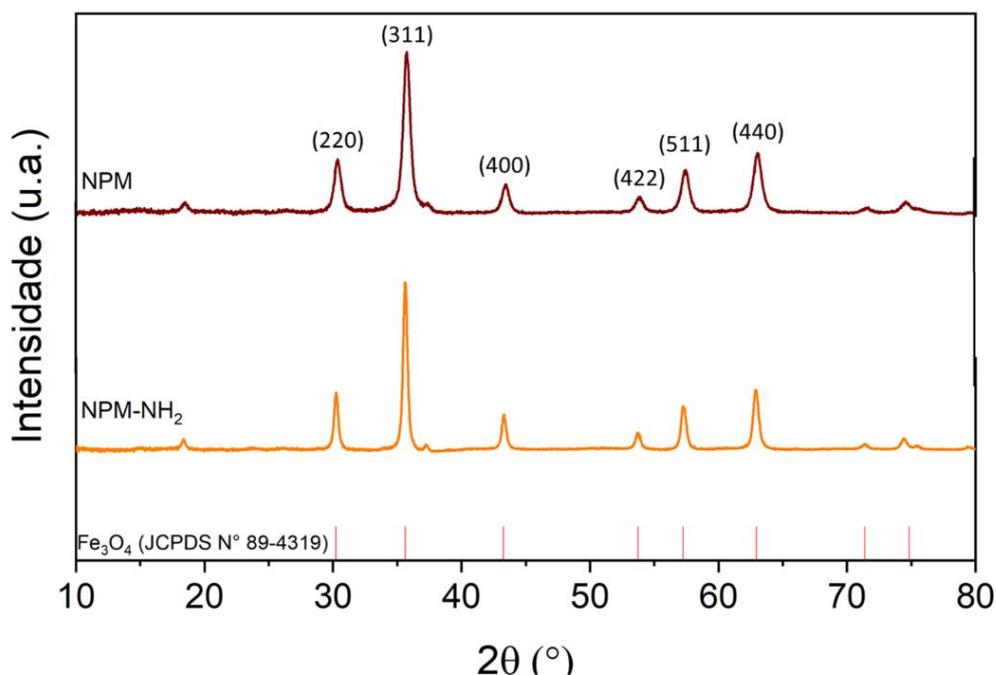
### **4.3 Resultados e discussão**

#### **4.3.1 Efeito de modificação de superfície em nanopartículas magnéticas**

A funcionalização consiste na modificação da superfície das nanopartículas, de modo a facilitar a interação tanto por ligações químicas quanto por interação eletrostática com outras moléculas. Diferentes substâncias podem ser empregadas na funcionalização, a depender do grupo funcional que se deseja na superfície das nanopartículas magnéticas. Neste trabalho, as nanopartículas magnéticas foram funcionalizadas com (3-aminopropil)trietoxi-silano (APTMS), de modo a resultar na adição de grupamento  $-\text{NH}_2$  na superfície como grupamento terminal. Durante o processo de funcionalização ocorre a formação de ligações Si-O-Fe por meio de reações de hidrólise e condensação (DE CROZALS *et al.*, 2016). Durante a hidrólise, são liberados etanol e silanol (Si-OH), o qual é condensado com auxílio do aquecimento, o que resulta no processo de funcionalização da superfície das nanopartículas (BRUCE; SEN, 2005).

Os resultados a seguir são apresentados de modo a confirmar a etapa de funcionalização da NPM, bem como apresentar as vantagens de tal modificação frente ao ensaio *in vitro*. A Figura 28 apresenta os difratogramas das amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub>, sendo possível verificar que as posições dos picos de difração para ambas as amostras estão condizentes com o padrão da magnetita (JCPDS N° 89-4319) e estão indexados como os planos cristalinos (220), (311), (400), (422), (511) e (440). Observa-se que a etapa de funcionalização com APTMS não causou mudança estrutural nas fases “*bulk*” deste óxido de ferro, conforme esperado.

**Figura 28.** Difratogramas obtidos para amostras de nanopartículas de óxido de ferro sintetizadas (NPM) e funcionalizadas com APTMS (NPM-NH<sub>2</sub>), com indexação dos picos em relação a ficha cristalográfica da magnetita (JCPDS N° 89-4319).



É importante ressaltar que a fase maghemita apresenta estrutura cristalográfica bastante semelhante à magnetita, sendo uma limitação da técnica de difração de raios X a diferenciação de ambas as fases. Porém, a maghemita é formada em meio ácido e apresenta coloração ocre, enquanto a magnetita é formada em meio básico e apresenta coloração preta (JOLIVET *et al.*, 2004), o que permite afirmar que a composição da amostra obtida é majoritariamente associada à fase magnetita. No entanto, a conversão de magnetita a maghemita se dá naturalmente por oxidação, podendo haver mistura de

fases, que só pode ser confirmado por outras técnicas, como as medidas de magnetização apresentadas posteriormente.

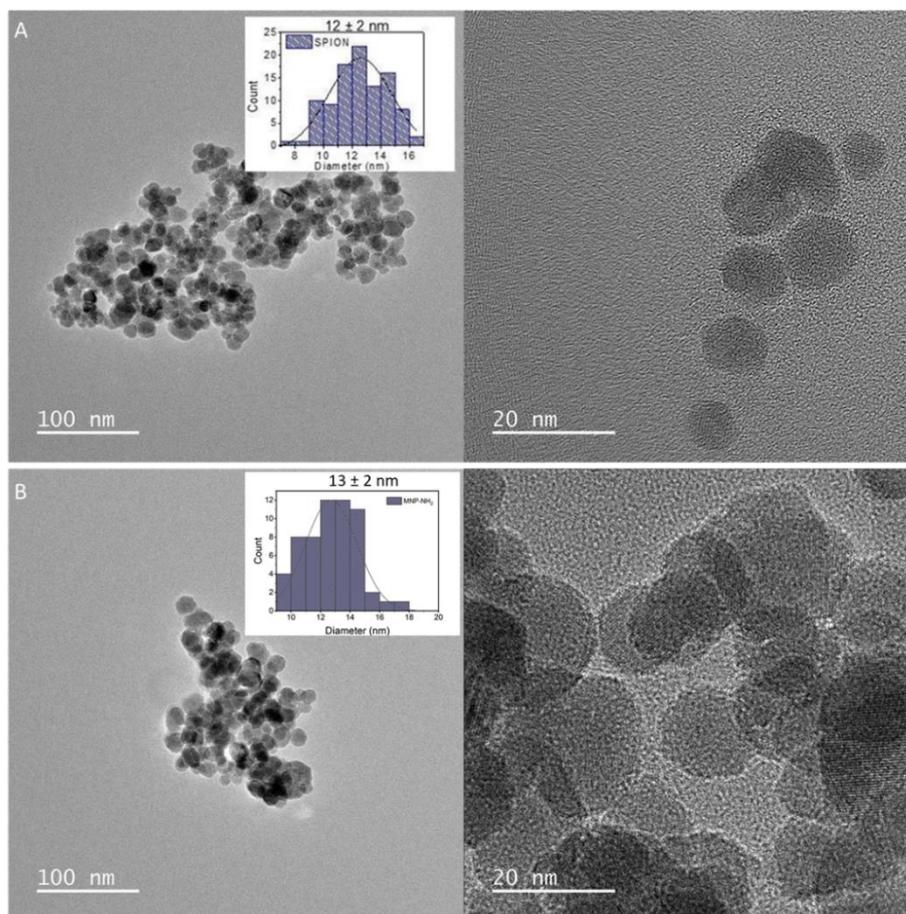
O tamanho de cristalito das amostras foi estimado pela Equação de Scherrer, na qual o tamanho de cristalito é inversamente proporcional à largura a meia altura do pico de difração (MUNIZ *et al.*, 2016). Usou-se como referência o pico de maior intensidade da fase correspondente ao plano (311), cujos valores estão indicados na Tabela 11. Os valores de tamanho de cristalito calculados foram iguais a 12,5 e 14,6 nm para as amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub>, respectivamente. Esses valores podem ser empregados como estimativas de dimensão de partícula e comparados com a dimensão obtida por meio da técnica de microscopia eletrônica de transmissão.

**Tabela 11.** Diâmetro médio de cristalitos estimados pela equação de Scherrer e seus respectivos parâmetros de cálculo.

<b>Amostra</b>	<b>2θ (°)</b>	<b>β (°)</b>	<b>D<sub>311</sub> (nm)</b>
NPM	35,74	0,70	12,5
NPM-NH <sub>2</sub>	35,62	0,60	14,6

As micrografias obtidas por microscopia eletrônica de transmissão são apresentadas na Figura 29 para ambas as amostras. A amostra de NPM apresentou morfologia esférica, com uma tendência à formação de aglomerados que podem ter sido provocados pelo modo de preparo das suspensões antes da análise ou devido à alta relação área/volume esperada para materiais com essas dimensões nanométricas, uma vez que o tamanho médio de partícula foi de  $12 \pm 2$  nm, conforme indicado no histograma de distribuição (Figura 29-A). O tamanho médio de partícula corresponde ao esperado mediante as condições de síntese utilizadas, estando dentro da faixa de tamanhos de materiais superparamagnéticos sintetizados de forma similar (HO; SUN; SUN, 2011). O tamanho obtido por microscopia corroborou o tamanho do cristalito estimado pela Equação de Scherrer, revelando que o tamanho das partículas se aproxima do tamanho dos cristalitos. Conforme pode ser observado na Figura 29-B, a funcionalização não provocou alteração na morfologia nem na distribuição de tamanhos das nanopartículas.

**Figura 29.** Análise morfológica de nanopartículas de magnetita e respectivo histograma de distribuição de A) nanopartículas puras e B) nanopartículas funcionalizadas.

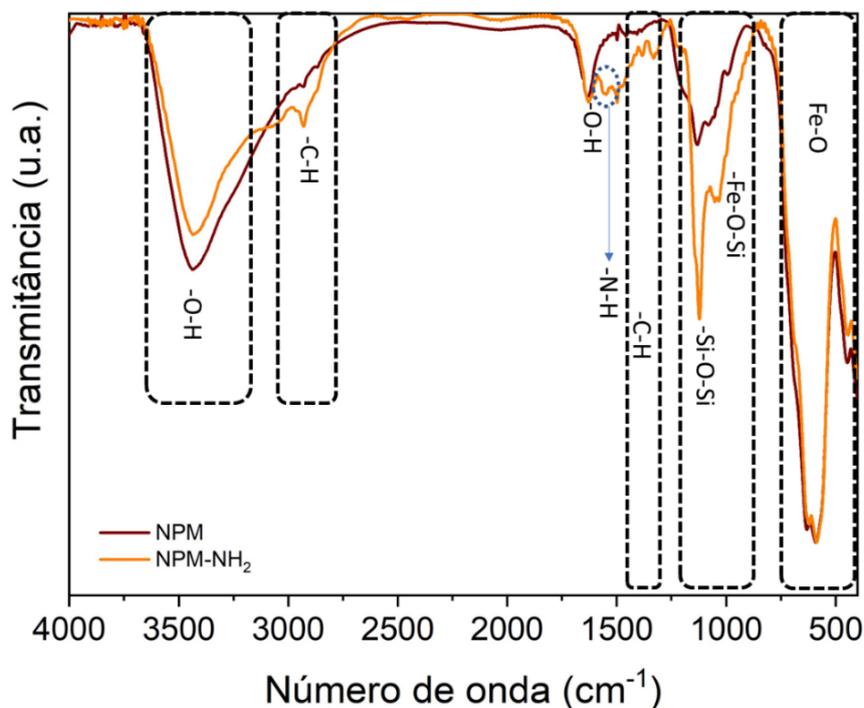


Os espectros obtidos na região do infravermelho, para as NPM puras e funcionalizadas são apresentados na Figura 30. A presença de nanopartículas de magnetita pode ser caracterizada por três bandas fortes de absorção por volta de 630, 590 e 445  $\text{cm}^{-1}$ , que correspondem ao estiramento da ligação Fe-O (STOIA *et al.*, 2016). As bandas de absorção na faixa de 3200-3600  $\text{cm}^{-1}$  e em 1625  $\text{cm}^{-1}$  são atribuídas às vibrações de estiramento e flexão do -OH da água ( $\text{H}_2\text{O}$ ) e grupos -OH adsorvidos a superfície da partícula (MOHAPATRA *et al.*, 2007).

Após a funcionalização com o APTMS, o espectro da amostra NPM-NH<sub>2</sub> apresentou uma banda de absorção relativa à deformação axial das ligações Si-O-Si e Si-O-Fe na faixa entre 1017 e 1123  $\text{cm}^{-1}$  (SOVIĆ *et al.*, 2011). Foram observados dois ombros relativos à deformação axial da ligação N-H em 1614  $\text{cm}^{-1}$  e 1547  $\text{cm}^{-1}$  (SHEN *et al.*, 2007). A presença do grupo propila ancorado foi confirmado pelo estiramento

vibracional C-H observado em 2929 e 2869  $\text{cm}^{-1}$ , confirmando assim a funcionalização com aminosilanos (YAMAURA *et al.*, 2004).

**Figura 30.** Espectros de FTIR das amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub>.

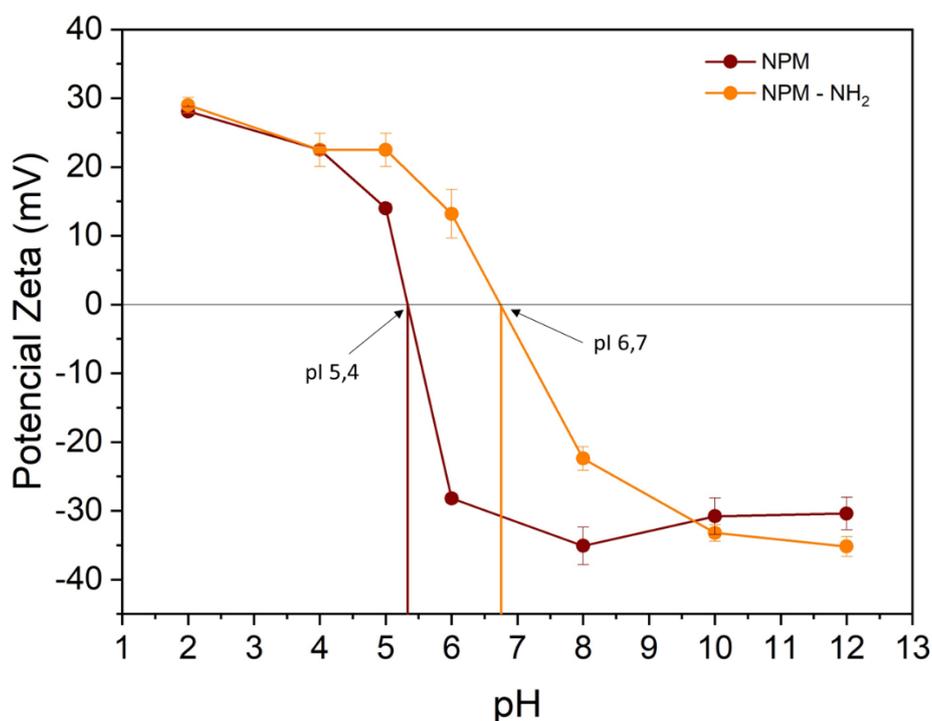


As propriedades coloidais das nanopartículas funcionalizadas (NPM-NH<sub>2</sub>) e da amostra precursora (NPM) foram realizadas para avaliar a funcionalização por meio do potencial de superfície, bem como o tamanho da partícula em diferentes meios por meio do diâmetro hidrodinâmico. As amostras foram analisadas por meio de medidas de potencial zeta em diferentes valores de pH para avaliar o impacto na carga da superfície proporcionada pelo grupo NH<sub>2</sub> em função do pH. A curva de potencial e o ponto isoelétrico resultantes desta análise podem ser observados na Figura 31. O potencial zeta, além de depender da natureza das partículas, sofre influência do líquido dispersante, sendo afetado pelo pH e pela força iônica do meio.

Para aplicações biológicas dois fatores são considerados desejáveis: a estabilidade das partículas em suspensão e a carga da superfície da partícula. As partículas com  $\zeta$  maiores do que 30 mV em módulo normalmente apresentam boa estabilidade coloidal. Com relação à carga, NPs com cargas de superfície positivas proporcionam uma melhor interação nas células, sendo incorporadas mais rapidamente e em maior número (HÜHN

*et al.*, 2013), uma vez que a superfície das membranas celulares possuem cargas negativas.

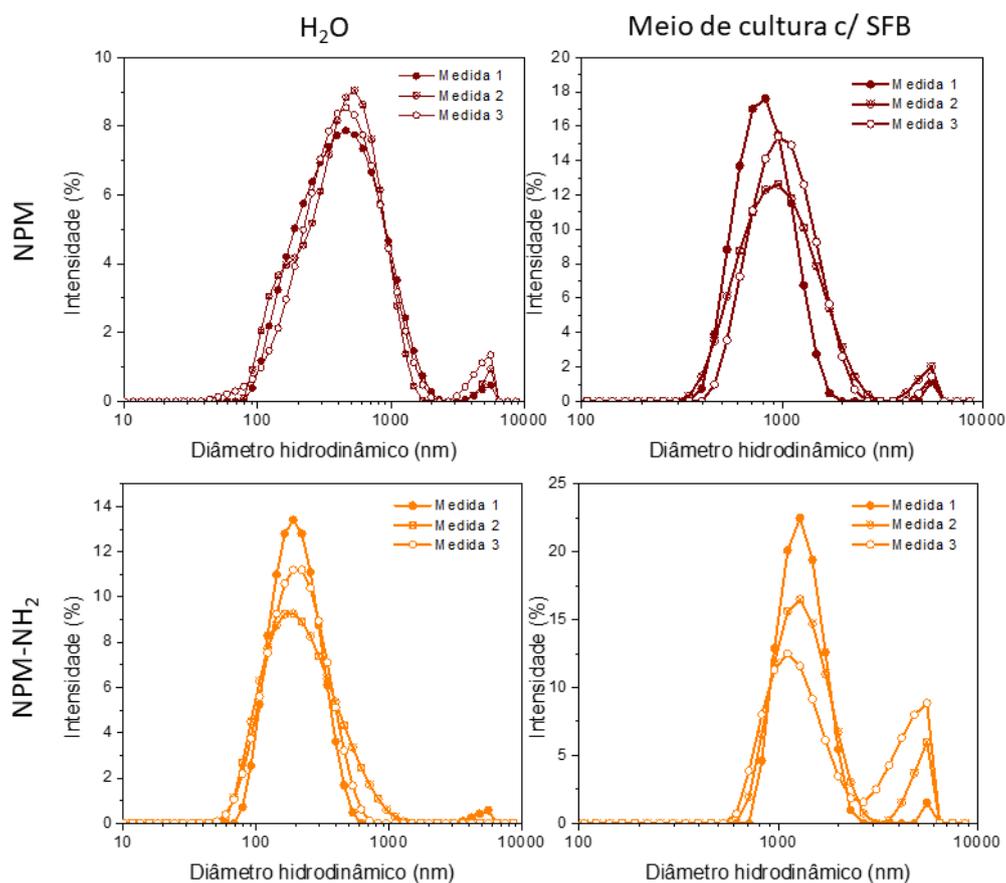
**Figura 31.** Curva de potencial zeta em função do pH (2-12) para as amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub> em água.



As medidas de potencial zeta das amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub> foram feitas ressuspendendo as nanopartículas em água e variando o pH (2 a 12) do meio. Conforme o pH aumenta, as cargas de superfícies passam de positiva para negativa, passando pelo ponto isoelétrico (pI) que, na ausência de adsorção específica, é igual ao ponto de carga zero. Os pontos isoelétricos para as amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub> foram estimados experimentalmente como iguais a 5,4 e 6,7, respectivamente, e o incremento de pI da NPM para a NPM-NH<sub>2</sub> corrobora os resultados de FTIR, confirmando a funcionalização. Este deslocamento do pI decorrente da funcionalização favorece a internalização das nanopartículas em células, uma vez que as nanopartículas se apresentam com potencial de superfície positivo em uma maior faixa de valores de pH. Vale lembrar que na via de absorção celular normalmente os nanomateriais passam por vários pHs diferentes de fluidos biológicos, como sangue (pH neutro), fluido intracelular (pH 6,8) e lisossomo (pH 4,5–5) (NGUYEN; LEE, 2017).

O diâmetro hidrodinâmico das partículas ( $\phi_H$ ) foi medido pela técnica de espalhamento dinâmico de luz (DLS), o qual fornece a soma do diâmetro da partícula com a camada de solvatação em relação ao meio em que esteja dispersa, como pode ser observado na Figura 32. Dessa forma, o valor obtido por esta técnica difere do valor observado na Figura 32. Dessa forma, o valor obtido por esta técnica difere do valor observado por microscopia eletrônica de transmissão, com desvios positivos. O  $\phi_H$  sofre variação, pois é dependente do meio no qual as NPs estão imersas, visto que há diferentes interações (meio, solutos e até entre partículas) resultando em diferentes valores de  $\phi_H$ , conforme observado nos resultados apresentados em água e meio de cultura com SFB (Figura 32), sendo importante a avaliação em meio aquoso, uma vez que serão aplicados em sistemas biológicos. Vale ressaltar que materiais com dimensões nanométricas apresentam uma forte tendência para aglomerar devido à elevada área específica. Por isso, quando dispersos em meios aquosos, apresentam valores de  $\phi_H$  muito mais elevados que o valor do diâmetro real da partícula singular (DOBROVOLSKAIA *et al.*, 2009).

**Figura 32.** Distribuição de tamanho da amostra NPM ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) obtidos por meio da medida de espalhamento dinâmico de luz em diferentes meios: água destilada e meio de cultura com SFB.



Ambas as amostras apresentaram o mesmo comportamento perante os diferentes meios, sendo possível observar (Tabela 12) um incremento do  $\phi_H$  das partículas analisadas em suspensão na presença de meio de cultura com SFB. Este incremento de diâmetro hidrodinâmico no meio de cultura era esperado, uma vez que o meio de cultura é rico em sais e carboidratos que podem induzir a aglomeração das nanopartículas. Além disso, a suplementação do meio com SFB induz a formação de corona proteica que aumenta o diâmetro hidrodinâmico das partículas individualmente, além de favorecerem a formação de agregados (MAIORANO *et al.*, 2010). É importante notar que os tamanhos médios foram calculados considerando apenas uma única população de partículas em cada caso, embora o gráfico mostre uma distribuição bimodal, pois a aglomeração das partículas, que leva a valores maiores, poderia aumentar consideravelmente o tamanho médio.

**Tabela 12.** Diâmetro hidrodinâmico para as amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub> para os diferentes meios utilizados: água e meio de cultura com SFB.

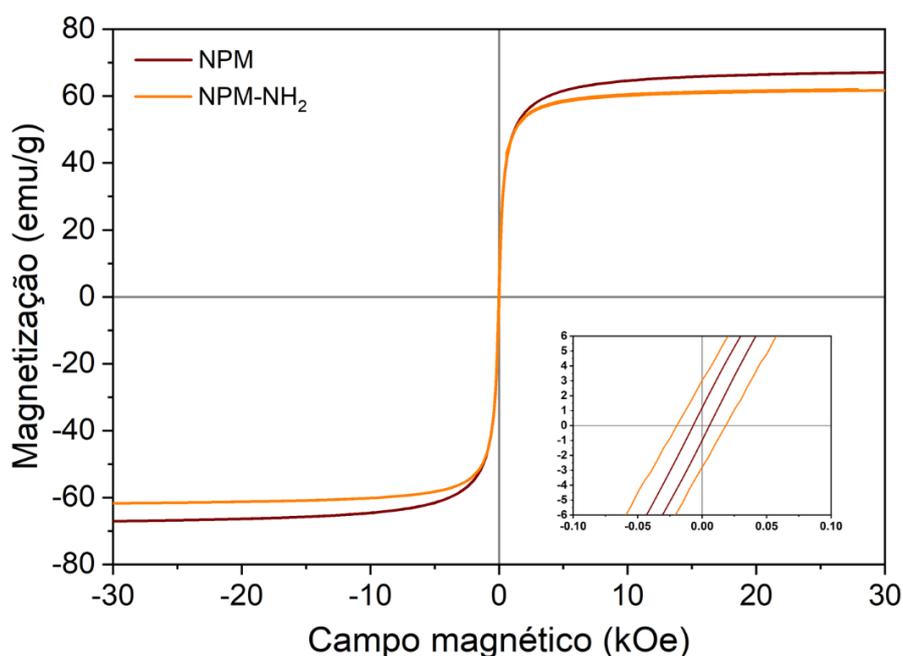
Amostra	$\phi_H$ (nm)	
	H <sub>2</sub> O	Meio de cultura com SFB
NPM	490 ± 29	931 ± 62
NPM-NH <sub>2</sub>	193 ± 3	1237 ± 83

Quando se analisa o comportamento do  $\phi_H$  em um mesmo meio, comparando a NPM sem e com funcionalização, não foi observada uma tendência. A funcionalização induziu uma redução de  $\phi_H$  em água e incremento em meio de cultura. Em água, as partículas funcionalizadas (NPM-NH<sub>2</sub>) apresentaram uma diminuição do  $\phi_H$  de 490 para 193 nm em relação às partículas não modificadas (NPM). Essa redução de agregação das nanopartículas pode ser atribuída ao aumento do módulo do potencial zeta no pH da água (em torno de pH 5,5), o que aumenta a repulsão eletrostática entre as nanopartículas. Adicionalmente, tem-se uma contribuição do impedimento estérico que os grupamentos aminosilanos conferem à partícula após funcionalização. Por outro lado, em meio de cultura com SFB foi observado um aumento expressivo do  $\phi_H$ , o que pode ser atribuído à formação da corona proteica resultante da interação das proteínas do soro com a superfície das NPs e que é favorecido pela presença de grupamentos funcionais ancorados na partículas (NGUYEN; LEE, 2017).

O  $\phi_H$  é um importante fator a ser considerado, visto que leva a mudanças na internalização celular das NPs, uma vez que esta condição é dependente do tamanho das mesmas e/ou de seus aglomerados. Além disso, o tamanho das NPs determina a distribuição no corpo, pois NPs com tamanhos diferentes são processadas pelo organismo de formas diferentes, podendo ser fagocitadas ou acumuladas em diferentes órgãos (GAUMET *et al.*, 2008).

As curvas de magnetização das partículas podem ser observadas na Figura 33. Ambas apresentaram um perfil superparamagnético e valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ) de 67,0 e 61,0 emu/g para NPM e NPM-NH<sub>2</sub>, respectivamente, corroborando resultados reportados na literatura (SANTOS *et al.*, 2018; PERECIN *et al.*, 2021; MOHAPATRA *et al.*, 2007), além de exibir magnetização de remanência e campo coercivo desprezíveis. Os valores de magnetização de saturação ( $M_s$ ), magnetização remanescente ( $M_r$ ) e campo coercivo ( $H_c$ ) extraídos a partir da curva de histerese são apresentados na Tabela 13. A pequena diminuição na magnetização de saturação da amostras NPM-NH<sub>2</sub> é uma indicação da funcionalização com APTMS, relacionada ao grupamento ligado à superfície da partícula magnética, que contribui como uma massa não magnética para o volume total da amostra (MENG *et al.*, 2018).

**Figura 33.** Curvas de magnetização para as amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH<sub>2</sub>) com suas respectivas ampliações da curva de histerese em função do campo magnético aplicado a 300 K.

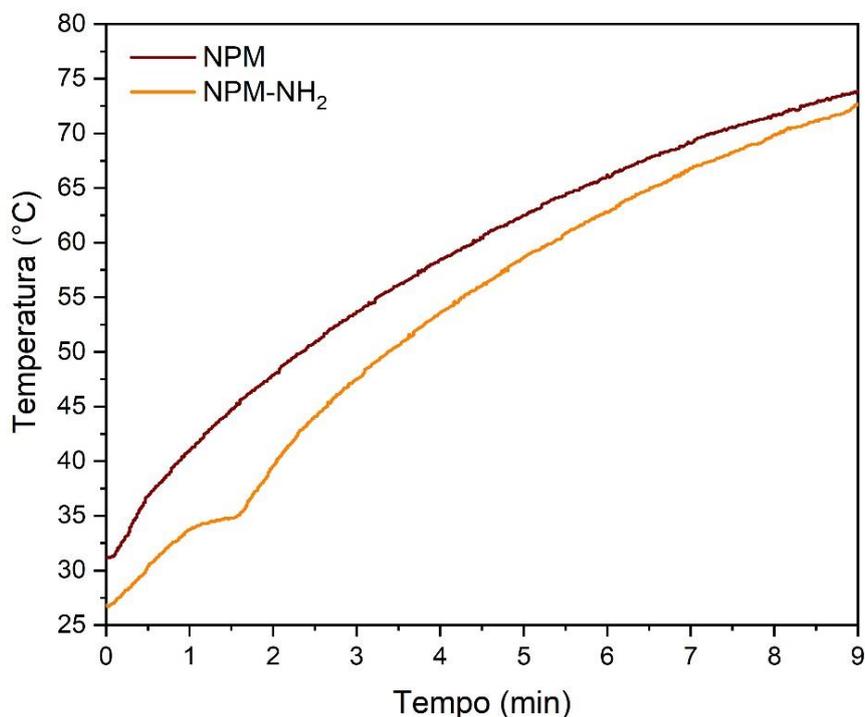


**Tabela 13.** Valores obtidos para magnetização de saturação ( $M_s$ ), magnetização remanescente ( $M_r$ ) e campo coercivo ( $H_c$ ) das amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH<sub>2</sub>).

Amostra	$H_c$ (kOe)	$M_r$ (emu.g <sup>-1</sup> )	$M_s$ (emu.g <sup>-1</sup> )
NPM	0,006	1,09	67,0
NPM-NH <sub>2</sub>	0,019	2,93	61,0

A eficiência de aquecimento das NPs foi avaliada em função da aplicação de um campo magnético alternado. A Figura 34 apresenta o perfil de liberação de calor das amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH<sub>2</sub>) e os valores de SAR e ILP calculados para as concentrações de 10 mg.mL<sup>-1</sup> estão apresentados na Tabela 14.

**Figura 34.** Perfil de liberação de calor das nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH<sub>2</sub>) – 10 mg/mL (em água), sob aplicação de um campo magnético a 275 Oe e 224 KHz.



**Tabela 14.** Valores obtidos para a taxa de absorção específica (SAR) e perda de potência específica (ILP) para as amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH<sub>2</sub>) na concentração de 10 mg/mL (em água).

Amostra	SAR (W g <sup>-1</sup> )	ILP (nHm <sup>2</sup> kg <sup>-1</sup> )
NPM	62,0	0,57
NPM-NH <sub>2</sub>	53,0	0,49

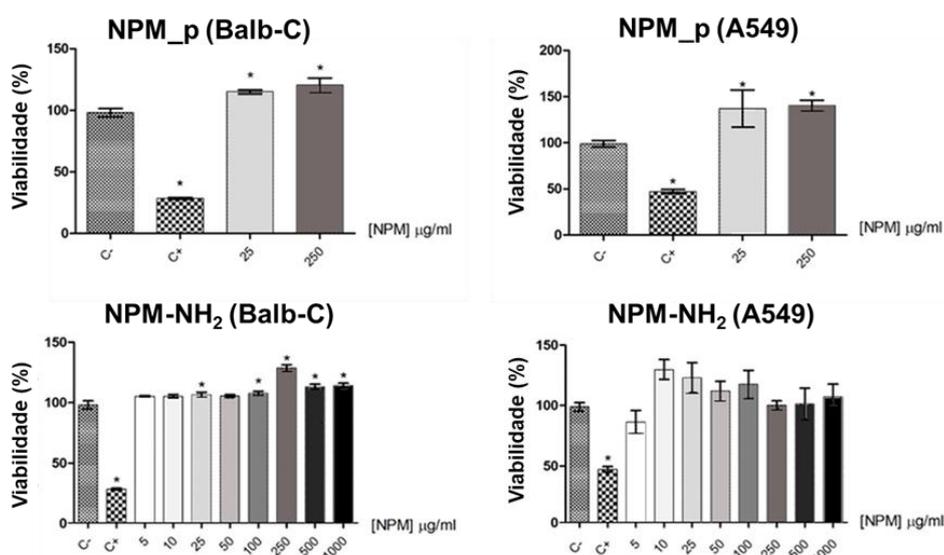
Valores de ILP variando de 0,2 a 3,1 nHm<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> foram relatados para ferrofluidos comerciais (KALLUMADIL *et al.*, 2009). No presente estudo, os valores de ILP obtidos foram iguais a 0,57 e 0,49 nHm<sup>2</sup>kg<sup>-1</sup> para as amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH<sub>2</sub>), respectivamente. Esses resultados estão alinhados com os dados experimentais relatados na literatura (HERVAULT; THANH, 2014) e são consistentes com as medições obtidas usando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM). Percebe-se que a funcionalização não afetou significativamente o perfil de liberação de calor das nanopartículas magnéticas, levando apenas a uma leve redução na liberação de calor, em consonância com a pequena redução da magnetização de saturação apresentada anteriormente.

Vale destacar uma inflexão irregular no início da curva de aquecimento da amostra NPM-NH<sub>2</sub>. Tal desvio pode estar relacionado à presença dos grupamentos funcionais na superfície da partícula, que pode estar influenciando a mobilidade da mesma em solução e pode ser atribuída à estabilidade coloidal das NPs e à relaxação de Brown, que é associado à rotação da partícula, na contribuição da relaxação magnética do perfil de aquecimento (SAVVA *et al.*, 2013). No entanto, as amostras apresentaram um perfil adequado de aquecimento, atingindo elevadas temperaturas em um período curto de exposição ao campo magnético, indicando que a funcionalização não impactou negativamente a capacidade de aquecimento das NPs. Os resultados foram considerados satisfatórios, uma vez que para aplicações biológicas, por exemplo, deseja-se um material que apresente uma boa capacidade de liberação de calor em um curto espaço de tempo, visando a uma menor exposição do organismo ao campo magnético.

### 4.3.2 Citotoxicidade e internalização dos nanossistemas magnéticos

Como primeira etapa dos ensaios biológicos, foi necessário avaliar o possível efeito citotóxico do sistema, antes da aplicação do campo magnético. Para avaliar este efeito, foi escolhido o ensaio do MTT, preconizado pela ISO 10993-5 (2009) para realização dos ensaios de citotoxicidade *in vitro*. Neste ensaio, é mostrada a viabilidade de forma proporcional à conversão do sal de tetrazólio (MTT) em cristais de formazan (cristais violeta) intracelulares. Tais cristais são posteriormente dissolvidos em DMSO e a absorvância é medida em espectrofotômetro em comprimento de onda ( $\lambda$ ) de 540 nm, descontada a absorvância medida em comprimento de onda de 690nm (branco). Os resultados (Figura 35) mostraram uma ausência de toxicidade em todas as concentrações testadas (após 24 h de exposição), tanto após interação celular com a partícula pura, quanto com a partícula funcionalizada com o grupo  $\text{NH}_2$ .

**Figura 35.** Ensaio de viabilidade celular (MTT) das amostras de nanopartículas pura (NPM) e funcionalizada (NPM-NH<sub>2</sub>) nas concentrações de 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000  $\mu\text{g/mL}$ .

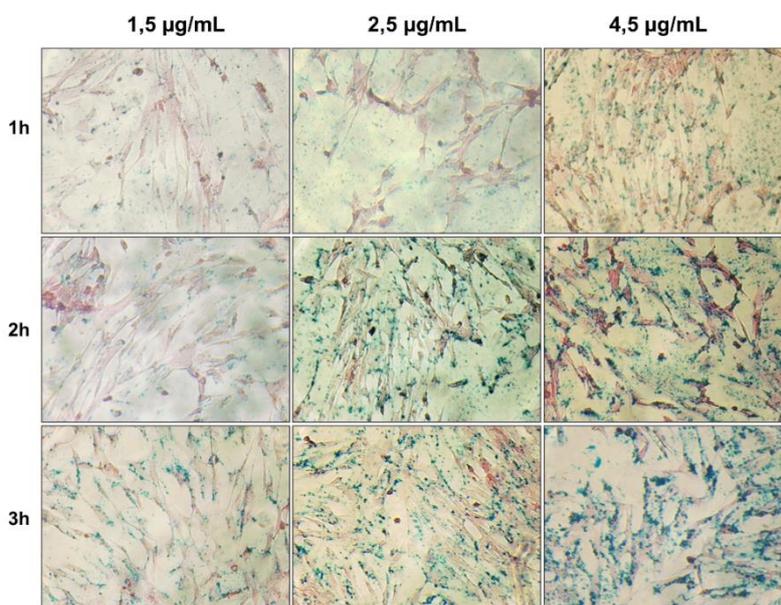


Uma vez confirmada a ausência de citotoxicidade, foi avaliada a internalização das partículas NPM-NH<sub>2</sub>. Os ensaios de internalização e validação de hipertermia magnética foram realizados apenas com as nanopartículas magnéticas funcionalizadas, uma vez que foram comprovadas as alterações em suas propriedades na seção anterior. Para avaliar a interação das partículas em células mesenquimais de mamífero, foi realizada a marcação com azul da Prússia. Esta técnica é considerada um dos testes

histoquímicos mais sensíveis, capaz de identificar até mesmo grânulos únicos de ferro nas células sanguíneas (PAWSAT *et al.*, 2021), sendo por isso a metodologia comumente empregada para avaliar a internalização das partículas de ferro (PONGRAC *et al.*, 2019).

A marcação com azul da Prússia solubiliza parcialmente a superfície das NPMs (com solução de ácido clorídrico), disponibilizando os cátions  $Fe^{3+}$  para interação com o ferrocianeto, resultando em um complexo de coloração azulada, que confirma a presença de ferro. As imagens (Figura 36) mostram a presença de ferro, dependente da dose e do tempo, após a interação das partículas (NPM-NH<sub>2</sub>) com células mesenquimais de mamífero. Além disso, nas imagens é possível observar a marcação com ferro seguindo a morfologia celular marcada na contra-coloração em rosa, que delimita os contornos da célula, indicando assim que provavelmente as partículas se encontram no citoplasma da mesma.

**Figura 36.** Interação da amostra NPM-NH<sub>2</sub> com células mesenquimais de mamífero realizada nos tempos de 1, 2 e 3 h em concentrações de 1,5, 2,5 e 4,5  $\mu\text{g/mL}$ .

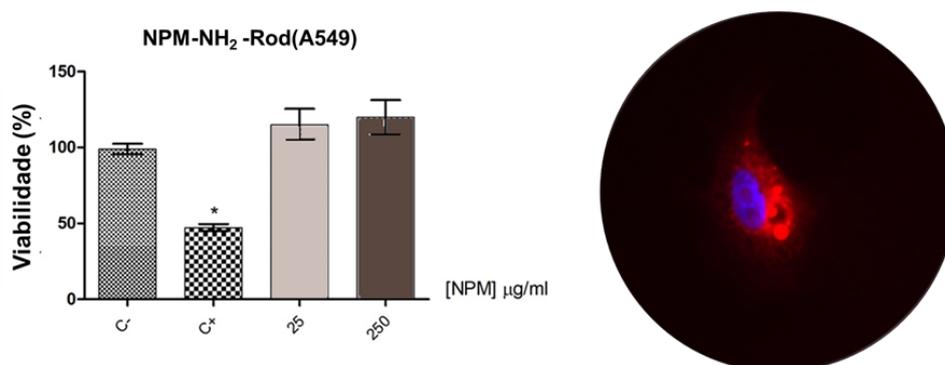


Contudo, a microscopia de luz convencional não apresenta resolução que garanta de fato a internalização das partículas, as quais podem se encontrar aderidas na membrana, mas não de fato internalizadas. Nas concentrações maiores de exposição é possível perceber a presença de agregados de nanopartículas que podem dificultar a internalização efetiva nas células, podendo estar refletida apenas a interação de aglomerados na superfície das células. Portanto, este foi apenas um ensaio preliminar para

avaliar a interação das NPMs com as células, não confirmando a internalização de maneira inequívoca.

Para confirmar a internalização efetiva, foi realizada a marcação das nanopartículas com a molécula fluorescente rodamina, que permite distinguir se as partículas marcadas com fluorescência em vermelho estão sendo internalizadas pelas células. Para garantir que a presença de rodamina não influencia a toxicidade do sistema, foi realizado um ensaio de viabilidade celular (Figura 37), confirmando a ausência de toxicidade, mesmo após a ancoragem da molécula fluorescente. Como pode ser observado na imagem representativa da direita na Figura 37, as nanopartículas (NPM-NH<sub>2</sub>) foram internalizadas pelas células, posicionando-se de forma perinuclear, porém sem serem internalizadas pela membrana nuclear. A marcação em vermelho no entorno do núcleo celular (em azul, marcação DAPI) e limitado pela membrana celular (acompanha a morfologia celular) confirmam a internalização das partículas.

**Figura 37.** Citotoxicidade e internalização de NPM-NH<sub>2</sub>-Rod em fibroblastos (BalbC).



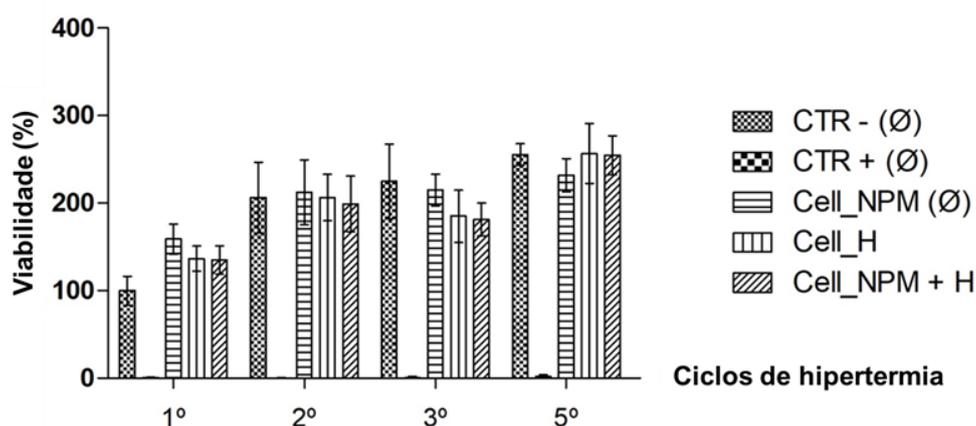
### 4.3.3 Prova de conceito da hipertermia magnética em modelo celular 2D

Uma vez realizada a caracterização físico-química das nanopartículas e confirmada a ausência de toxicidade e internalização celular das mesmas, foi realizado um ensaio para avaliar o efeito de hipertermia magnética das partículas em células tumorais de mamífero (A549, células tumorais de pulmão). Neste ensaio, a concentração de NPM-NH<sub>2</sub> foi fixada em 100 µg/mL e foram aplicados 5 ciclos de campo magnético alternado, em condições de campo e frequência compatíveis com aplicações terapêuticas.

Para realizar uma medida tempo-dependente da viabilidade celular após cada ciclo de hipertermia aplicada, foi realizado o ensaio de citotoxicidade com o reagente *Presto*

*blue*, baseado na redução realizada pelas células vivas, do corante à base de resazurina, permeável às células. A resazurina é reduzida a resorufina, passando de uma cor azul para uma cor rosa fluorescente. Este ensaio, ao contrário do MTT, permite avaliar a viabilidade celular com as células ainda vivas, o que permite o acompanhamento da viabilidade celular do mesmo conjunto amostral ao longo do experimento (JASMIN *et al.*, 2011). Os resultados (Figura 38) mostraram um crescimento celular ao longo dos dias de cultivo, seguindo a curva de crescimento celular, todavia sem apresentar uma redução da viabilidade celular, apesar da cumulação de vários ciclos de aplicação de campo magnético.

**Figura 38.** Ensaio de viabilidade tempo dependente de *Presto Blue* realizado após exposição de 100 µg/mL de nanopartículas, com campo magnético alternado aplicado em 5 ciclos repetidos. Os resultados são a média ± desvio padrão de uma triplicata experimental.



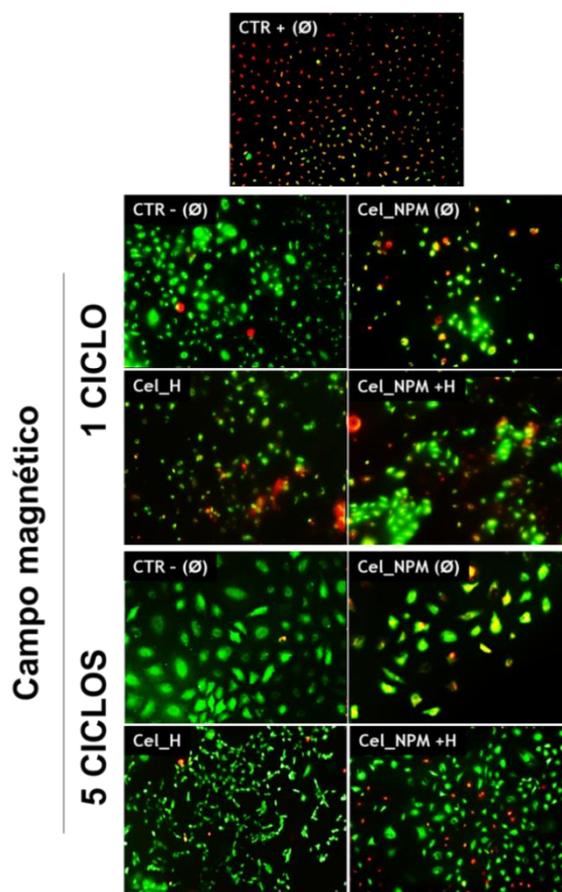
Nota: Ø - sem aplicação de campo magnético e H - com aplicação de campo magnético.

Contudo, o teste *Presto Blue* apresenta limitações consideráveis quando se trata de avaliação do efeito citotóxico de nanomateriais de cor escura. Sendo um teste baseado na medição da absorvância do sobrenadante celular, a presença de nanopartículas escuras pode interferir com o princípio do teste e criar falsos positivos, incrementando de forma artificial a absorvância e não correspondendo à real viabilidade celular (MBEH *et al.*, 2015). Portanto, para eliminar possíveis interferências foi realizado o teste de citotoxicidade *live/dead*, baseado na dupla de corantes calceína e iodeto de propídio. O corante de Calceína AM (não fluorescente), quando em contato com as células viáveis, é convertido em um corante Calceína polianiônico, de cor verde e fluorescente no

comprimento de onda ( $\lambda$ ) entre 495–515 nm. Já o corante Homodímero de Etídio 1 (EthD-1) penetra apenas em células com as membranas rompidas (mortas), ligando-se aos ácidos nucleicos e exibindo uma fluorescência em vermelho quando excitado em um comprimento de onda ( $\lambda$ ) entre 495–635 nm.

A Figura 39 mostra o controle de morte celular exposto ao SDS, apresentando poucas células viáveis. Em contraste, poucas mudanças na viabilidade celular (muitas células viáveis) foram observadas quando as células foram expostas às nanopartículas sem aplicação de campo magnético ou com aplicação de campo sem exposição às nanopartículas, quando comparadas com o controle negativo, representado por células viáveis. Contudo foi observada morte celular após o primeiro ciclo de hipertermia de 50 minutos, que se tornou mais significativa após o 5º ciclo de campo magnético. Portanto, o efeito de aplicação de campo magnético em células colocadas em contato com nanopartículas magnéticas parece ser promissor como alternativa terapêutica.

**Figura 39.** Ensaio de *live and dead* após aplicação de campo magnético de  $15,5 \text{ KA m}^{-1}$  e  $f \text{ 307 KHz}$ . Células tumorais (A549) foram expostas a  $100 \text{ }\mu\text{g/mL}$  de NPM-NH<sub>2</sub>. O controle de morte celular foi exposto a 1% de SDS 30 min antes da realização do ensaio.



## 4.4 Conclusão

As nanopartículas preparadas apresentaram boa estabilidade em solução aquosa, com diâmetro médio de 12,0 nm, as quais foram funcionalizadas com grupo NH<sub>2</sub> utilizando-se o reagente APTMS. Tais partículas apresentaram magnetização de saturação de 67 e 61 emu.g<sup>-1</sup> (a 300 K) para as amostras NPM e NPM-NH<sub>2</sub>, respectivamente, e mostraram ser promissoras para internalização em células-tronco mesenquimais. É importante ressaltar que tanto a dose quanto o tempo de incubação são variáveis significativas e contribuem positivamente no processo de marcação.

Com base nos resultados obtidos, sugere-se que a marcação com a NPM seja realizada em tempos maiores, para garantir a internalização das partículas e não apenas adesão à membrana celular, e em concentrações maiores, desde que a viabilidade celular não seja afetada, para aumentar a eficiência da internalização.

Na validação biológica, as nanopartículas foram bem internalizadas em várias linhagens celulares, não causando citotoxicidade. Isso indicou a possibilidade de desenvolver uma ampla gama de aplicações potenciais para os nanossistemas estudados, especialmente em rastreamento celular e teranóstico. Uma prova de conceito de hipertermia magnética em cultivo celular 2D de células tumorais de pulmão (A549) mostraram que a terapia baseada em nanopartículas magnéticas e exposição a campo magnético alternado é promissora, considerando ao menos cinco ciclos de exposição ao campo.

## 4.5 Cooperações técnicas e produções científicas

### 4.5.1 Colaborações

O presente Capítulo foi desenvolvido com as seguintes colaborações:

- 1) **Jasmin** – Professora do Núcleo Multidisciplinar de Pesquisa UFRJ/Xerém em Biologia: ensaios de rastreamento de células tronco mesenquimais, empregando as nanopartículas magnéticas desenvolvidas no presente trabalho.
- 2) **Jéssica Dornelas da Silva** – CEO da startup Nanoonco3D: ensaios biológicos de citotoxicidade e internalização em células de mamíferos, incluindo ensaios de hipertermia magnética em modelo celular 2D.

#### 4.5.2 Orientações

O presente Capítulo desdobrou nas seguintes orientações/supervisões:

- 1) **Tayná Cunha** – Mestranda do Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ), está desenvolvendo dissertação intitulada “Efeito do potencial elétrico de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro sobre a remodelação de macrófagos”, sob orientação da professora Helen da Conceição Ferraz e minha colaboração (previsão de defesa mestrado: 2023.2). Defendeu trabalho de conclusão de curso de Engenharia Química, da Universidade Federal Fluminense – UFF, intitulado “Obtenção de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e avaliação do potencial dos nanomateriais como suportes enzimáticos na imobilização de lipase” em 2019, sob orientação da professora Ana Carla Coutinho e minha coorientação.
- 2) **Victor Essus** – Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, está desenvolvendo dissertação intitulada “Influência do tamanho e potencial de superfície de nanopartículas magnéticas no desenvolvimento de sistemas de purificação de DNA”, sob orientação da professora Juliana Reis Cortines e minha colaboração (previsão de defesa mestrado: 10/2023).

#### 4.5.3 Produções científicas

Este capítulo resultou na apresentação dos seguintes trabalhos em congresso:

- 1) *Production of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and stem cells labeling*, apresentado na modalidade pôster no 8<sup>th</sup> *Latin-American Symposium on Animal Cell Technology* (SLATCC 2018) - avaliado como um dos dez melhores trabalhos entre 80 pôsteres apresentados.
- 2) *Efficiency of multiple applications of magnetic hyperthermia in lung tumor cells using aminosilane coated iron oxide nanoparticles*, apresentado na modalidade oral (virtual) no XIX **Brazil MRS Meeting (SBPMat 2021)**.

# 5 CAPÍTULO V

## Desenvolvimento de Nanopartículas Poliméricas Contendo Extrato de Cúrcuma e Nanopartículas Superparamagnéticas

Não é sobre ter todas as  
pessoas do mundo pra si  
É sobre saber que em algum  
lugar alguém zela por ti  
É sobre cantar e poder  
escutar mais do que a própria  
voz  
É sobre dançar na chuva de  
vida que cai sobre nós

É saber se sentir infinito  
Num universo tão vasto e  
bonito, é saber sonhar  
Então fazer valer a pena  
Cada verso daquele poema  
sobre acreditar

Não é sobre chegar no topo  
do mundo e saber que  
venceu  
É sobre escalar e sentir que o  
caminho te fortaleceu  
É sobre ser abrigo e também  
ter morada em outros  
corações  
E assim ter amigos contigo  
em todas as situações

A gente não pode ter tudo  
Qual seria a graça do mundo  
se fosse assim?  
Por isso, eu prefiro sorrisos

E os presentes que a vida  
trouxe pra perto de mim

Não é sobre tudo que o seu  
dinheiro é capaz de comprar  
E sim sobre cada momento,  
sorriso a se compartilhar  
Também não é sobre correr  
contra o tempo pra ter  
sempre mais  
Porque quando menos se  
espera a vida já ficou pra trás

Segura teu filho no colo  
Sorria e abraça os teus pais  
enquanto estão aqui  
Que a vida é trem-bala,  
parceiro  
E a gente é só passageiro  
prestes a partir

Laiá, laiá, laiá, laiá, laiá  
Laiá, laiá, laiá, laiá, laiá

Segura teu filho no colo  
Sorria e abraça os teus pais  
enquanto estão aqui  
Que a vida é trem-bala  
parceiro  
E a gente é só passageiro  
prestes a partir

Trem-Bala (Ana Vilela)

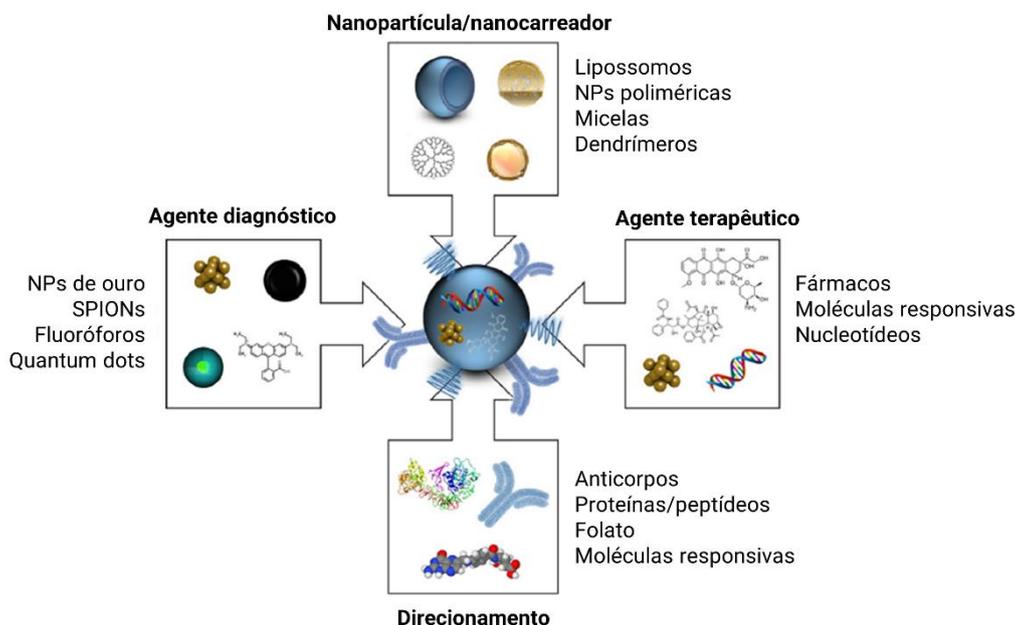
## 5.1 Contextualização

A nanomedicina teranóstica, ou nanoteranóstica, é capaz de integrar diagnóstico e tratamento em uma única plataforma, empregando nanomateriais. Ao longo dos anos, os avanços nesta área têm gerado novas modalidades terapêuticas, incluindo tratamento de doenças não invasivas e monitoramento em tempo real da liberação de medicamentos e distribuição localizada (GOLOVIN *et al.*, 2018). Essa abordagem possibilita o tratamento direcionado, evitando danos às células saudáveis e reduzindo o risco de superdosagem e os custos de um tratamento. Consequentemente, o diagnóstico precoce pode melhorar a sobrevivência do paciente, enquanto o tratamento otimizado pode oferecer alta eficácia terapêutica e perfil de segurança aprimorado (WONG *et al.*, 2020).

O uso de nanomateriais possuindo múltiplas modalidades de imagem e capacidades terapêuticas é a chave para um tratamento eficaz em nanoteranóstica. Algumas vantagens significativas dos nanomateriais incluem seu tamanho reduzido, elevada superfície em relação ao volume e suas notáveis propriedades ópticas e elétricas (KHALID *et al.*, 2020). Esses nanomateriais podem conter várias construções químicas, como uma porção de direcionamento para ligação celular específica, agentes terapêuticos ou agentes de diagnóstico, podendo ser associados a biomarcadores ou revestidos em matriz polimérica que confere estabilidade coloidal e apresenta grupos funcionais para bioconjugação (KIM *et al.*, 2019; MENDES *et al.*, 2018). Uma representação esquemática do uso de nanomateriais em nanomedicina teranóstica pode ser observada na Figura 40.

As nanopartículas poliméricas, como as nanopartículas de PMMA, por exemplo, têm sido amplamente consideradas nos últimos anos para o encapsulamento/revestimento de diversos nanomateriais. Este polímero sintético apresenta alta estabilidade química, biocompatibilidade, ausência de toxicidade e boas propriedades mecânicas (AHANGARAN *et al.*, 2019; DHIVYA *et al.*, 2018).

**Figura 40.** Representação esquemática do uso de nanomateriais em nanomedicina teranóstica: a combinação de várias estruturas em nanocarreadores multifuncionais permite seu uso em diagnóstico por imagem e abordagens terapêuticas.



Fonte: Adaptado de MENDES *et al.*, (2018).

Em vista disso, revestimentos poliméricos são frequentemente utilizados em nanomateriais para conferir diversas funcionalidades aos nanossistemas, incluindo resistência ao desgaste, resistência mecânica potencializada, proteção contra corrosão, biocompatibilidade, condutividade elétrica/química e propriedades de superfície personalizáveis (SMITH; LAMPROU, 2014). Uma abordagem eficaz para prolongar o tempo de circulação dos agentes de contraste em ressonância magnética por imagem é incorporá-los em materiais poliméricos, que conferem propriedades “furtivas” aos agentes, reduzindo assim sua depuração pelo sistema imunológico (JANIB *et al.*, 2010).

Dentre os diversos métodos de obtenção de imagem, as técnicas que envolvem a obtenção de imagem por fluorescência resultam no maior custo-benefício, devido à sensibilidade e visualização não invasiva (NGUYEN *et al.*, 2016). Muitos cromóforos estão disponíveis para esta finalidade, sendo os corantes orgânicos, como a rodamina e a fluoresceína, os mais utilizados. Corantes de origem natural podem constituir uma escolha assertiva, devido à baixa toxicidade quando comparado a corantes sintéticos. Neste cenário, curcuminoides são uma excelente escolha de biomarcador devido às propriedades fluorescentes, além de propriedades biológicas notáveis, como atividade

antioxidante, anti-inflamatória, bactericida e antitumoral (PRIYADARSINI, 2014; HUSSAIN *et al.*, 2017).

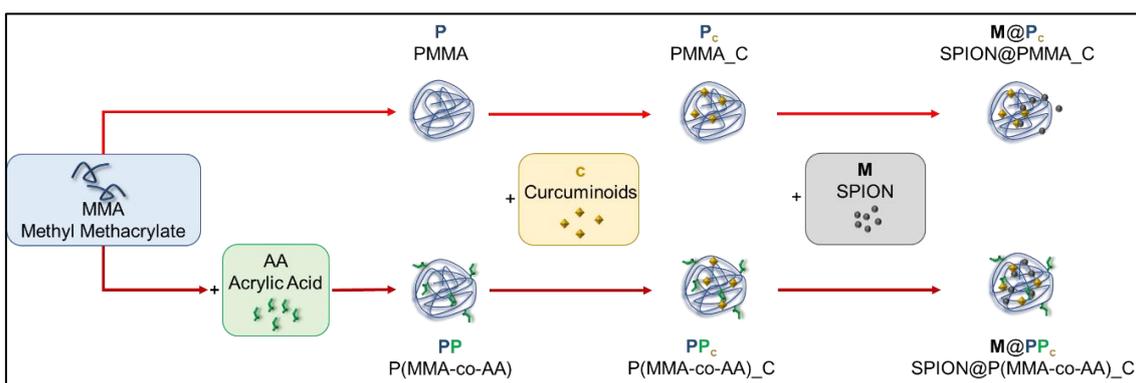
Apesar dos excelentes benefícios farmacológicos, o uso clínico da curcumina é limitado por sua baixa biodisponibilidade *in vivo*, principalmente devido à natureza hidrofóbica e baixa solubilidade em água (HUSSAIN *et al.*, 2017). Para superar essa limitação, vários métodos têm sido investigados para aumentar a biodisponibilidade e prevenir a degradação química, como a conjugação da curcumina com nanopartículas inorgânicas, como sílica (XU *et al.*, 2016), óxido de ferro (BALASUBRAMANIAN *et al.*, 2014) e ouro (SINDHU *et al.*, 2014). Outra abordagem envolve encapsular a curcumina em hidrogel (GONG *et al.*, 2013), micelas (SAHU *et al.*, 2008) e nanopartículas poliméricas (PRABHA; RAJ, 2016).

Atualmente, o uso de nanopartículas magnéticas (NPM) tem ganhado destaque em aplicações biomédicas devido às propriedades ajustáveis por funcionalização de superfície (MATERÓN *et al.*, 2021). Além disso, a funcionalização da superfície das NPM com sílica, polímeros e outros materiais pode ampliar o escopo de aplicações potenciais, além de conferir estabilidade ao sistema, inibir a oxidação de núcleos magnéticos e promover a dispersão de nanopartículas em ambientes biológicos (SANTOS *et al.*, 2021; MATERÓN *et al.*, 2021).

Em trabalhos recentes, alguns autores destacaram o potencial de nanopartículas magnéticas revestidas com polímeros para diferentes aplicações. YANG *et al.* (2019) desenvolveram uma nanoplataforma magnética que responde à acidez do tumor, permitindo uma terapia fotodinâmica eficaz e diagnóstico por imagem. Ambos os experimentos *in vitro* e *in vivo* resultaram em acúmulo tumoral bem-sucedido e ativação do fotossensibilizador, levando a melhores resultados de diagnóstico por imagem e tratamento do câncer. RUAN *et al.* (2022) desenvolveram uma plataforma nanoteranóstica usando SPIONs encapsulados com um polímero específico para facilitar a entrega eficiente de curcumina ao cérebro, permitindo o diagnóstico de alta sensibilidade da doença de Alzheimer e a eliminação de placas  $\beta$ -amiloides. Esses estudos promissores enfatizam coletivamente os rápidos avanços na nanoteranóstica, demandando ainda maior exploração de aplicações potenciais para sistemas em nanoescala para materializar o conceito de nanomedicina personalizada na prática clínica.

Em vista do que foi apresentado, no presente capítulo, foram projetadas, sintetizadas e caracterizadas nanoplateformas teranósticas multifuncionais baseadas em SPIONs, extrato de cúrcuma e polímeros acrílicos, combinando propriedades fluorescentes e magnéticas, como pode ser observado no Esquema 3.

**Esquema 3.** Síntese dos nanomateriais: PMMA (P), PMMA\_C (P<sub>c</sub>), SPION@PMMA\_C (M@P<sub>c</sub>), P(MMA-co-AA) (PP), P(MMA-co-AA)\_C (PP<sub>c</sub>) e SPION@P(MMA-co-AA)\_C (M@PP<sub>c</sub>).



Fonte: Autoria própria.

Para produzir tais materiais fluorescentes de base polimérica estável em meio aquoso, foi empregada a miniemulsão direta para polimerizar o monômero (metacrilato de metila, MMA) sozinho ou na presença do co-monômero (ácido acrílico, AA). A curcumina foi incorporada ao nanossistemas mediado por extração (extrato de cúrcuma) em uma etapa, empregando o monômero MMA como solvente extrator (procedimento apresentado no Capítulo III), evitando etapas que incluem processos de separação, purificação e ressuspensão. Além disso, para garantir que os SPIONs se concentrassem na fase orgânica da nanoemulsão, foi avaliada a melhor condição de estabilidade da emulsão em uma etapa de pré-polimerização.

No presente capítulo, além das caracterizações físico-químicas dos nanossistemas obtidos, são apresentados estudos a respeito das propriedades magnéticas/fluorescentes, além de avaliações celulares como citotoxicidade e internalização, confirmando o potencial da nanoplateforma desenvolvida para uso como agente teranóstico.

## 5.2 Materiais e Métodos

### 5.2.1 Especificação dos insumos

**Sínteses:** cloreto de ferro (III) hexahidratado ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 97%), hidróxido de amônio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ , 30%), ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 95%), cloreto de cálcio dihidratado ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 97%), bicarbonato de sódio ( $\text{NaHCO}_3$ , 95 %), pó de ferro ( $\text{Fe}^0$ , 99,5%), metacrilato de metila ( $\text{CH}_2\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_3$ , MMA – 99%), ácido acrílico ( $\text{CH}_2\text{CHCOOH}$ , AA – 99%), peróxido de benzoíla ( $(\text{C}_6\text{H}_5\text{CO})_2\text{O}_2$ , BPO – 75%, restante água), hexadecano ( $\text{C}_{16}\text{H}_{34}$ , HD – 99%), dodecil sulfato de sódio ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{11}\text{OSO}_3\text{Na}$ , SDS – 99%) e hidroquinona ( $\text{C}_6\text{H}_4$ -1,4-(OH)<sub>2</sub>, HQ – 99%) foram adquiridos da MERCK (Alemanha) e usados como recebidos. O sulfato de ferro (II) heptahidratado ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 99%) foi adquirido da ACS (Brasil) e foi previamente purificado por óxido-redução, na presença de pó de ferro em meio ácido, e recristalizado. A cúrcuma em pó comercial de pureza alimentar (contendo o composto curcumina (C)), foi adquirido da Kitano (Brasil) e usado sem purificação adicional.

**Ensaio biológico:** meio *Eagle* modificado por *Dulbecco* (DMEM) alta glicose, soro fetal bovino (SFB), antibióticos penicilina-estreptomicina (PS), brometo de metiltiazolil-difenil-tetrazólio (MTT), dimetilsulfóxido (DMSO), paraformaldeído (PFA), *Triton*<sup>®</sup> X- 100, solução salina tamponada com fosfato (PBS), albumina de soro bovino (BSA), *Fluoroshield*<sup>®</sup> com DAPI foram adquiridos da *MERCK* (Alemanha). *Alexa Fluor*<sup>®</sup> 546 *Phalloidin* foi adquirido da *Thermo Fisher Scientific* (Massachusetts, EUA). O ar sintético com 5% de  $\text{CO}_2$  foi adquirido da White Martins (Brasil).

### 5.2.2 Métodos

#### 5.2.2.1 Síntese das nanopartículas magnéticas (SPIONs)

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro foram sintetizadas pelo método de coprecipitação (BEDÊ *et al.*, 2017), como descrito na Seção 4.2.2.

#### 5.2.2.2 Síntese das nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas à base de PMMA puro ou copolimerizado com ácido acrílico (P(MMA-co-AA)) foram obtidas pelo método de polimerização direta em miniemulsão descrito por CAMPOS *et al.* (2019). A pré-emulsão foi preparada misturando-se uma determinada quantidade das fases orgânica e aquosa sob agitação

mecânica, conforme especificações da Tabela 15. Em seguida, a mistura foi sonicada (sonicador *Branson*, modelo *450 Digital Sonifier*, EUA) por 5 minutos (120 W e 20 kHz) e transferida para um reator de vidro encamisado de 100 mL, equipado com banho termostático e controlado a 80 °C e sob agitação mecânica constante (500 rpm). Um condensador foi conectado ao reator para evitar a perda do monômero durante a reação (duas horas). O látex final foi armazenado em frasco de vidro âmbar sob refrigeração (3 – 5 °C) e identificado como “P” para PMMA ou “PP” para P(MMA-co-AA).

Durante a reação, alíquotas do meio reacional (1,0 mL) foram coletadas para avaliar a conversão de monômeros por gravimetria. As amostras foram colocadas em um recipiente de alumínio contendo 0,5 mL de uma solução aquosa de hidroquinona (1,0% em peso) para interromper os processos de polimerização. As amostras foram aquecidas sob vácuo a 80 °C até que nenhuma variação de massa fosse observada.

**Tabela 15.** Proporções mássicas de reagentes empregados na polimerização de P(MMA-co-AA) por miniemulsão direta.

<b>Fase</b>	<b>Componentes</b>	<b>Função</b>	<b>Teor (% p/p)*</b>	<b>Teor (% p/p)**</b>
<b>Orgânica (20,0%)</b>	MMA	Monômero	100,0	90,0
	AA	Co-monômero	-	10,0
	BPO	Iniciador	3,0 ***	3,0 ***
	HD	Co-estabilizante	0,5 ***	0,5 ***
<b>Aquosa (80,0%)</b>	H <sub>2</sub> O	Solvente	100,0	100,0
	SDS	Surfactante	1,0 ***	1,0 ***
	NaHCO <sub>3</sub>	Agente tamponante	0,1 ***	0,1 ***

Nota: \*Preparo de PMMA; \*\*Preparo de P(MMA-co-AA); \*\*\*em relação ao monômero.

### 5.2.2.3 Adição da curcumina à base polimérica

A preparação do extrato de cúrcuma foi realizada com base na metodologia proposta por SHIRSATH *et al.* (2017) e MARTINS *et al.* (2023), usando o monômero como solvente, conforme descrito na Seção 3.2.2. O encapsulamento da curcumina (componente majoritário do extrato de cúrcuma) em nanopartículas poliméricas de

PMMA ou P(MMA-co-AA) seguiu o mesmo procedimento descrito na Seção 5.2.2.2, sendo em ambos os casos a carga inicial de MMA substituída pela carga de extrato de cúrcuma (0,5% p/p em MMA). O látex final foi armazenado em frasco de vidro âmbar sob refrigeração (3 – 5 °C) e identificado como “P<sub>c</sub>” para o encapsulamento da curcumina em PMMA ou “PP<sub>c</sub>” para o encapsulamento da curcumina em P(MMA-co-AA).

#### **5.2.2.4 Obtenção dos nanossistemas multifuncionais**

O encapsulamento da curcumina e de SPIONs em PMMA ou P(MMA-co-AA) seguiu o mesmo procedimento descrito nas Seções 5.2.2.3 e 5.2.2.4. Em ambos os casos, a carga inicial de MMA puro foi substituída por uma carga de extrato de cúrcuma (0,5% p/p em MMA). Além disso, SPIONs (1,0% p/p em relação ao monômero) foram adicionados na fase orgânica. Os nanossistemas obtidos foram armazenados em frasco de vidro âmbar sob refrigeração (3 – 5 °C) e identificados como M@P<sub>c</sub> (nanossistema contendo PMMA) ou M@PP<sub>c</sub> (nanossistema contendo P(MMA-co-AA)).

### **5.2.3 Caracterização dos nanossistemas**

#### **5.2.3.1 Cromatografia de permeação em gel (GPC)**

A cromatografia de permeação em gel (GPC, *Malvern Viscotek* modelo *Max VE2001*, Reino Unido) foi usada para determinar as distribuições de massa molar das NPs poliméricas. O GPC é equipado com uma coluna linear (KF-804L e KF-805L) fornecida pela *Shodex* (Japão) com um tamanho máximo de poro de 1500 Å e 5000 Å e um detector refratométrico *Malvern Viscotek* (modelo VE3580, Reino Unido). O solvente tetrahydrofurano (THF) grau HPLC foi usado como fase móvel na coluna GPC.

#### **5.2.3.2 Potencial zeta e Diâmetro hidrodinâmico (DLS)**

O diâmetro hidrodinâmico ( $\phi_H$ ) e potencial de superfície ( $\zeta$ ) foram avaliados por espalhamento dinâmico de luz (DLS) e potencial zeta, respectivamente. Ambas as caracterizações foram medidas usando o equipamento da *Malvern R*, modelo *Nano-ZS*, Reino Unido. As amostras foram diluídas em água e sonicadas antes das medições.

#### **5.2.3.3 Difração de raios X (DRX)**

Os dados de difração de raios X (DRX) das amostras em pó foram coletados em um difratômetro da *Malvern Panalytical* (modelo *Empyrean*, Reino Unido), com radiação CuK<sub>α</sub> de  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$  e equipado com um detector *PIXcel*. Os difratogramas foram

obtidos na faixa de  $2\theta$  entre 10 e 80°, com passo de 0,02° e tempo por passo de 150 s. O tamanho do cristalito do SPION foi calculado pela Equação de Scherrer (Equação 5, Seção 4.2.5.2).

#### **5.2.3.4 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR)**

A análise de espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com um espectrofotômetro *PerkinElmer*, modelo *Spectrum Two*, EUA (com resolução de 2 cm<sup>-1</sup>) usando pastilhas de KBr. Os espectros dos nanossistemas foram gerados em uma faixa de comprimento de onda de 400 a 4000 cm<sup>-1</sup>.

#### **5.2.3.5 Termogravimetria (TGA)**

A estabilidade térmica das amostras foi investigada usando um equipamento de termogravimetria (TGA) *PerkinElmer*, modelo STA 6000, EUA. As amostras foram aquecidas da temperatura ambiente até 800 °C a uma taxa de aquecimento de 10 °C min<sup>-1</sup> sob fluxo de nitrogênio (20 mL min<sup>-1</sup>).

#### **5.2.3.6 Microscopia eletrônica de transmissão (MET) e varredura (MEV)**

As caracterizações morfológicas das amostras foram realizadas por microscopia eletrônica de transmissão (MET) e de varredura (MEV). As imagens de SPIONs, no modo MET, foram obtidas em um instrumento *JEOL* (modelo *2100F*, Japão) operado em uma tensão de aceleração de 200 kV com uma câmera CCD (*GATAN Orius*, modelo *SC1000*, EUA). As amostras foram dispersas em etanol e, em seguida, colocadas em uma grade de cobre com filme de carbono e secas ao ar antes da análise. A distribuição de tamanho de partícula foi obtida a partir de imagens da análise de MET, medindo o diâmetro de cerca de 200 partículas usando o *software ImageJ*. As imagens de MEV das nanopartículas finais foram obtidas em um instrumento *JEOL* (modelo *7100FT*, Japão) operado a uma tensão de aceleração de 10 kV, e distância de trabalho de 10 mm. Os mapas elementares foram obtidos por espectroscopia de raios X de energia dispersiva (EDS) *Thermo Scientific* (modelo *Noran System 7*, EUA).

#### **5.2.3.7 Magnetometria de amostra vibrante (VSM)**

O comportamento magnético das amostras e os principais parâmetros magnéticos (magnetização de saturação e coercividade) foram realizados à temperatura ambiente (300 K) no aparelho *Physical Property Measurement System (PPMS)* da *Quantum Design*

(modelo *DynaCool*, EUA) utilizando a opção *Vibrating Sample Magnetometer* (VSM-SQUID) sob campo magnético de até  $\pm 9$  T.

#### **5.2.3.8 Hipertermia magnética**

Um indutor magnético *Ambrell* (modelo *Easy Heat EH 3542 LI*, Reino Unido) foi usado para realizar os ensaios de hipertermia magnética. Um frasco de vidro contendo 1,0 mL de uma dispersão aquosa de  $1,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  para o nanossistema SPION e  $100,0 \text{ mg.mL}^{-1}$  para os nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> (a maior concentração é atribuída ao fato de que esses materiais continham apenas 1,0% de SPION) foi colocado em um calorímetro com isolamento térmico a vácuo. A suspensão foi exposta a um campo magnético alternado com frequência ( $f$ ) de 224 kHz e amplitude (H) de 596 Oe (200 A) por 15 min, o qual era acionado por uma bobina, gerando um campo magnético alternado induzido, enquanto um termômetro de fibra óptica mede a mudança de temperatura. A eficiência de aquecimento dos diferentes nanossistemas, sob ação do campo magnético alternado, foi quantificada usando a taxa de absorção específica (SAR) e os valores foram normalizados para os parâmetros extrínsecos, como amplitude de campo e frequência, para obter a perda de potência intrínseca (ILP). As equações empregadas para obter estes parâmetros já foram descritas no Capítulo 4 (Seção 4.2.5.6, Equações 6 e 7).

#### **5.2.3.9 Caracterização das propriedades fluorescentes**

A fluorescência dos nanossistemas (estado sólido) foi verificada em diferentes comprimentos de onda em um microscópio fluorescente invertido *Zeiss* (modelo *AXIO observer A*, Alemanha) em 488 nm, 564 nm e UV. A absorvância e a fluorescência destes nanossistemas (em solução) foram realizadas utilizando um espectrofotômetro UV-vis *Shimadzu* (modelo UV-2450, Japão) e um espectrofluorímetro *Edinburgh Instruments* (modelo *FL900 CD*, Escócia). Antes das análises, as amostras foram solubilizadas em THF com concentração final do extrato de  $4,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os espectros UV-vis foram coletados na faixa de 300 a 500 nm usando uma cubeta de quartzo (com caminho óptico de 1,0 cm). A emissão de fluorescência foi investigada usando o comprimento de onda de excitação ( $\lambda_{\text{ex}}$ ) de 410 nm com uma fenda de 1,0 nm e um passo de 1,0 nm.

## 5.2.4 Ensaios biológicos

### 5.2.4.1 Exposição celular

A linhagem celular de osteossarcoma humano (SAOS-2) foi semeada em alta densidade ( $6 \times 10^4$  células  $\text{cm}^{-2}$ ), para avaliar a citotoxicidade, e baixa densidade ( $1 \times 10^4$  células  $\text{cm}^{-2}$ ), em lamínulas, para avaliar a internalização. As células foram cultivadas em meio DMEM com alto teor de glicose suplementado com 15% de soro fetal bovino e 1% de antibióticos (PS) a 37 °C, 95% de umidade e 5% de  $\text{CO}_2$ . Após 24 h de adesão, as células foram expostas a 0,1; 1,0 e 10,0 mg/mL contendo os nanossistemas P, PP, P<sub>c</sub>, PP<sub>c</sub>, M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> previamente lavados em água e ressuspensos em meio DMEM com alto teor de glicose e suplementado com 15% de soro bovino fetal e 1% de antibióticos (PS). As células foram incubadas por 24 horas em atmosfera umidificada com 5% de  $\text{CO}_2$  e 37 °C.

### 5.2.4.2 Ensaio de citotoxicidade

Após a exposição do material, as células foram incubadas com 0,5 mg.mL<sup>-1</sup> de MTT por 4 h a 37 °C e, em seguida, o cristal de formazan formado pelas células vivas foi dissolvido em solvente orgânico DMSO. A absorvância foi lida a 570 nm (violeta) e a absorvância de fundo (690 nm) foi subtraída. A viabilidade celular foi expressa como a média  $\pm$  desvio padrão resultante de três experimentos independentes.

### 5.2.4.3 Ensaio de internalização

Após a exposição das células (SAOS-2 em lamínulas) aos nanossistemas, as mesmas foram fixadas com paraformaldeído 4%, lavadas duas vezes. Para aumentar a permeabilidade da membrana, as células foram incubadas por 5 minutos com *Triton X-100* 0,1% em PBS. As células foram lavadas duas vezes e depois incubadas com 2 unidades de *Alexa Fluor® 546 Phalloidin* a temperatura ambiente por 30 min. Em seguida, as células foram lavadas e, para corar os núcleos, foi utilizada resina DAPI GOLD para montar lamínulas em lâminas de vidro. As amostras foram observadas com um microscópio fluorescente *Zeiss* (modelo *Axio Plan II*, Alemanha) em 488 nm (coloração do material), 564 nm (coloração de actina) e UV – 365 nm (coloração de núcleos).

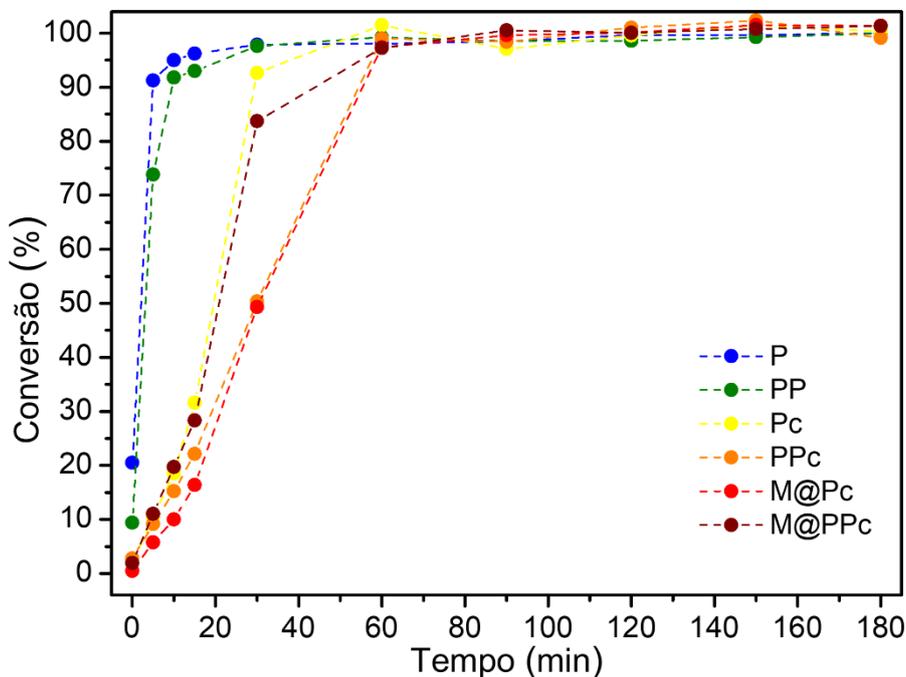
### 5.3 Resultados e discussão

#### 5.3.1 Síntese dos nanossistemas contendo polímero, curcumina e SPIONS

Para a obtenção dos nanossistemas M@Pc e M@PPc, foi utilizado o método de miniemulsão. Um ensaio de otimização foi conduzido para determinar a concentração de ferro que mantém a estabilidade da fase orgânica/aquosa ao incorporar os SPIONS na matriz polimérica. O objetivo era concentrar os SPIONS na fase orgânica (monômero), preservando a estabilidade do equilíbrio hidrodinâmico entre as fases orgânica e aquosa. A concentração de 1% p/p (SPIONS em relação ao monômero) resultou em melhor estabilidade. Observou-se que concentrações superiores a 1% de SPIONS podem induzir instabilidade no equilíbrio líquido-líquido entre as fases aquosa e orgânica (Anexo ).

O perfil de conversão em função do tempo dos nanossistemas obtidos por polimerização em miniemulsão é mostrado na Figura 41. Os resultados revelaram uma alta taxa de conversão do monômero para polímero puro e copolímero (P e PP), atingindo cerca de 95% de conversão em 10 e 20 minutos de reação, respectivamente. MANGIA *et al.* (2021) observaram o mesmo perfil de conversão rápida para formação de nanopartículas de PMMA e P(MMA-co-AA), empregando o método de miniemulsão nas mesmas condições, com a diferença de usar persulfato de potássio (KPS) como iniciador em fase aquosa. CAMPOS *et al.* (2016) também obtiveram resultados semelhantes para conversão de homo e copolímeros. Neste caso, KPS e BPO foram usados como iniciadores de reação, mas com uma carga de apenas 0,5% em peso para o monômero. No presente trabalho, a carga de iniciador foi utilizada em um nível superior (3,0% em peso em relação ao monômero) para compensar os efeitos inibitórios causados pela curcumina, o que pode ser observado por conta da redução na taxa de conversão de todas as nanopartículas poliméricas obtidas na presença de curcumina (P<sub>c</sub>, PP<sub>c</sub>, M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>), retornando um comportamento semelhante aos polímeros puros, mas com um deslocamento de conversão máxima para cerca de 45 minutos de reação. Este atraso na cinética de polimerização promovida pela curcumina também foi observado para a polimerização em massa dos mesmos polímeros acrílicos (MARTINS *et al.*, 2023).

**Figura 41.** Conversão de monômeros (MMA e AA) no polímero puro PMMA (P) e copolímero P(MMA-co-AA) (PP), na presença de curcumina (P<sub>c</sub> e PP<sub>c</sub>) e na presença de SPION + curcumina (M@ P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> ) em função do tempo para polimerização em miniemulsão.



Um perfil semelhante foi observado para a polimerização na presença de curcumina e SPIONs (M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>), porém com uma tendência de inversão da máxima velocidade de reação entre homo- e copolímero (em geral a conversão do homopolímero cresce mais rapidamente que a do copolímero). Este comportamento sugere que os SPIONs podem estar catalisando a reação na presença do comonômero. Dado o aumento da acidez promovido pelo ácido acrílico, a solubilização parcial dos SPIONs pode ter sido favorecida, de modo que a presença de íons Fe<sup>+2</sup>/Fe<sup>+3</sup> em solução pode acelerar a decomposição do iniciador (BPO) e aumentar a concentração de radicais na reação, o que, conseqüentemente, pode provocar o aumento da taxa de polimerização, considerando que esta é uma polimerização baseada em radicais livres (BEYAZ; TANRISEVER; KOÇKAR, 2010).

Além da conversão, foram realizadas medições das distribuições de massas molares dos polímeros obtidos em diferentes condições. Os valores obtidos para massa molar ponderal média (M<sub>w</sub>) e índice de polidispersão (M<sub>w</sub>/M<sub>n</sub>) podem ser observados na Tabela 16. Os resultados revelam que a massa molar do homopolímero e do

copolímero preparados na ausência de curcumina e nanopartículas de SPION foi superior a  $10^3$  kDa. Os valores médios de Mw e Mw/Mn são consistentes para a obtenção dos referidos polímeros acrílicos pela metodologia de miniemulsão (MANGIA *et al.*, 2021).

**Tabela 16.** Tamanho hidrodinâmico ( $\phi_H$ ), potencial zeta ( $\xi$ ), índice de polidispersão (PDI) e massa molar ponderal média das amostras (Mw) em água deionizada (pH = 5,5).

Material	Mw (kDa)	Mw/Mn	$\phi_H$ (nm)	PDI	$\zeta$ (mV)
<b>M (SPION)</b>	-	-	$53,9 \pm 0,87$	$0,20 \pm 0,003$	$-45,2 \pm 0,51$
<b>P</b>	1089,00	1,94	$109,2 \pm 0,50$	$0,06 \pm 0,018$	$-75,8 \pm 1,37$
<b>PP</b>	1173,10	2,46	$138,6 \pm 0,78$	$0,15 \pm 0,042$	$-70,1 \pm 6,74$
<b>P<sub>c</sub></b>	501,41	3,05	$131,4 \pm 0,95$	$0,23 \pm 0,011$	$-74,5 \pm 3,19$
<b>PP<sub>c</sub></b>	568,16	2,84	$161,6 \pm 1,82$	$0,26 \pm 0,010$	$-78,6 \pm 2,31$
<b>M@P<sub>c</sub></b>	184,64	2,90	$150,7 \pm 1,93$	$0,22 \pm 0,008$	$-87,0 \pm 3,89$
<b>M@PP<sub>c</sub></b>	451,16	3,17	$226,0 \pm 2,75$	$0,32 \pm 0,005$	$-65,3 \pm 0,95$

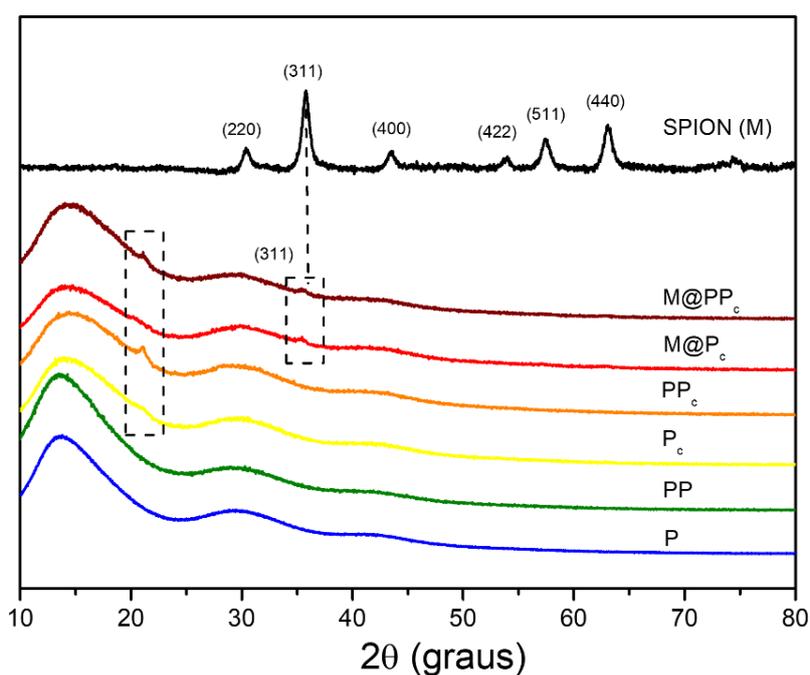
Por outro lado, a polimerização conduzida na presença de curcumina levou a massa molar média a cair pela metade. Esse mesmo perfil foi observado nas reações conduzidas em massa, quando na presença de curcumina na mesma concentração (MARTINS *et al.*, 2023). A introdução de SPION no meio reacional induziu uma redução de massa molar para o homopolímero a cerca da metade, mas a massa molar foi mantida no caso do copolímero. Esse comportamento distinto do homo- e do copolímero na presença de SPIONs corrobora a hipótese anteriormente apresentada de maior disponibilidade de íons ferro no meio reacional decorrente da solubilização parcial promovida pelo ambiente ácido induzido pelo comonômero.

Um estudo publicado por QIU *et al.* (2007) sugere que a introdução de SPIONs aumenta a geração de radicais e bolhas de cavitação durante o processo de síntese iniciado por ultrassom. O aumento da concentração de radicais promove sítios de nucleação e facilita a mais rápida transferência de radicais para gotículas de monômeros, resultando em redução da massa molar. No entanto, também destacam que a inclusão de partículas encapsuladas leva a tamanhos hidrodinâmicos maiores, em comparação com formulações de polímero puro. Este aumento no tamanho hidrodinâmico ( $\phi_H$  e PDI) causado pela influência de SPIONs também foi observado no presente trabalho. No entanto, a presença apenas de curcumina adicional não induziu variações significativas no diâmetro

hidrodinâmico das nanopartículas poliméricas obtidas. Além disso, o potencial zeta ( $\zeta$ ) para todas as amostras foi negativo em meio aquoso, dada a influência do tensoativo aniônico empregado. Os elevados valores de potencial de superfície observados confirmam a estabilidade coloidal das nanopartículas obtidas nessas condições (CAMPOS *et al.*, 2016).

Todos os nanossistemas também foram caracterizados utilizando diferentes técnicas (DRX, FTIR e TGA), a fim de avaliar a influência da curcumina e do SPION sobre a composição do material polimérico. Os difratogramas obtidos para os nanossistemas são apresentados na Figura 42. A amostra SPION mostra seis ângulos de reflexão principais em valores de  $2\theta$  iguais a  $30,3^\circ$ ,  $35,7^\circ$ ,  $43,5^\circ$ ,  $53,7^\circ$ ,  $57,4^\circ$  e  $63,1^\circ$  indexados como [220], [311], [400], [422], [511] e [440], planos de rede da estrutura cristalina espinélio correspondente à magnetita ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ou maghemita ( $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ), de acordo com os padrões JCPDS (N° 89-4319). O tamanho do cristalito, determinado pela Equação de Scherrer para a amostra SPION foi de 12 nm, o que corroborou valores previamente descritos na literatura (HONG *et al.*, 2009) e valores apresentados no capítulo anterior para diâmetro médio de partículas avaliado por microscopia eletrônica de transmissão.

**Figura 42.** Padrão de difração de raios X (DRX) para a estrutura cristalina do SPION (linha preta) e para os nanossistemas (amorfos) P (linha azul), PP (linha verde), P<sub>c</sub> (linha amarela), PP<sub>c</sub> (linha laranja), M@P<sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP<sub>c</sub> (linha vinho).



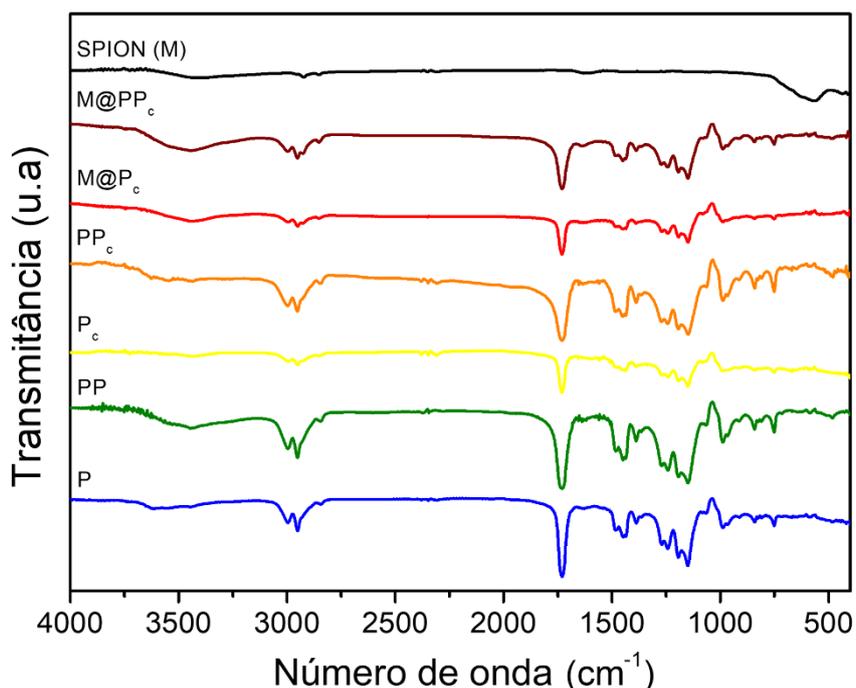
Os nanossistemas P, PP, P<sub>c</sub>, PP<sub>c</sub>, M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> exibiram dois picos largos em torno de valores de 2θ iguais a 14,5° e 29,9°, que estão associados à estrutura amorfa do PMMA ou P(MMA-co-AA) (PAN; ZHANG; CHEN, 2009) . Além disso, os padrões DRX para os nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> apresentaram pico correspondente ao ângulo de reflexão [311] do SPION em 2θ igual a 35,7°, confirmando a presença de nanopartículas de óxido de ferro. Um pico menor observado em torno de 2θ igual a 22-24° sugere que uma fração diminuta de cristais de curcumina pode coexistir com o domínio de curcumina predominantemente amorfo que está integrado ao polímero, o que está de acordo as descobertas anteriores relatadas por DONSI *et al.* (2010). Este pico pode ser observado com menor intensidade para os nanossistemas P<sub>c</sub> e M@P<sub>c</sub>, o que pode ser atribuído à maior solubilidade da curcumina no homopolímero do que no copolímero (mais hidrofílico).

Os espectros de FTIR dos nanossistemas são apresentados na Figura 43. O espectro para o SPION (linha preta) apresentou um pico característico em ~ 575 cm<sup>-1</sup>, que é referente à vibração da ligação Fe–O e está de acordo com os valores da literatura (MISHRA *et al.*, 2014). Os espectros do homopolímero (linha azul) e do copolímero (linha verde) apresentaram picos em regiões semelhantes. Foi observado, em torno de 1730 cm<sup>-1</sup> um forte pico característico do estiramento da ligação C=O (grupo éster). Outros picos característicos do PMMA foram observados em 2951/2995 cm<sup>-1</sup> (alongamento C-H simétrico/assimétrico) com o pico de flexão correspondente em 1448 cm<sup>-1</sup> e cerca de 1242 cm<sup>-1</sup> (alongamento C-O-C) (KUSHWAHA *et al.*, 2017; AZIZ *et al.*, 2019). Devido à semelhança das regiões dos picos da curcumina com o PMMA, não foi possível distinguir os picos da molécula dentro dos nanossistemas. No entanto, um pico de baixa intensidade associado a SPION nos nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> foi detectado em aproximadamente 580 cm<sup>-1</sup>.

As curvas termogravimétricas (TGA) e suas derivadas (DTG) para todos os nanossistemas estudados podem ser observadas na Figura 44. As curvas exibem diferenças perceptíveis, indicando que a curcumina exerce forte impacto sobre a decomposição do composto. Para o homopolímero (P) e copolímero (PP) puros, apenas duas etapas estão envolvidas na degradação do material. O primeiro estágio é representado por um pequeno pico localizado a 290 °C, devido à clivagem das unidades vinílicas terminais (GAŁKA *et al.*, 2014), levando a uma perda de massa em torno de 10%. A segunda etapa corresponde à maior perda de massa (quase 90%) localizada na

faixa de 300 – 400 °C, devido ao início da cisão aleatória e à clivagem das ligações mais estáveis entre as unidades ligadas ao longo da cadeia polimérica (GAŁKA *et al.*, 2014; SAIN *et al.*, 2012).

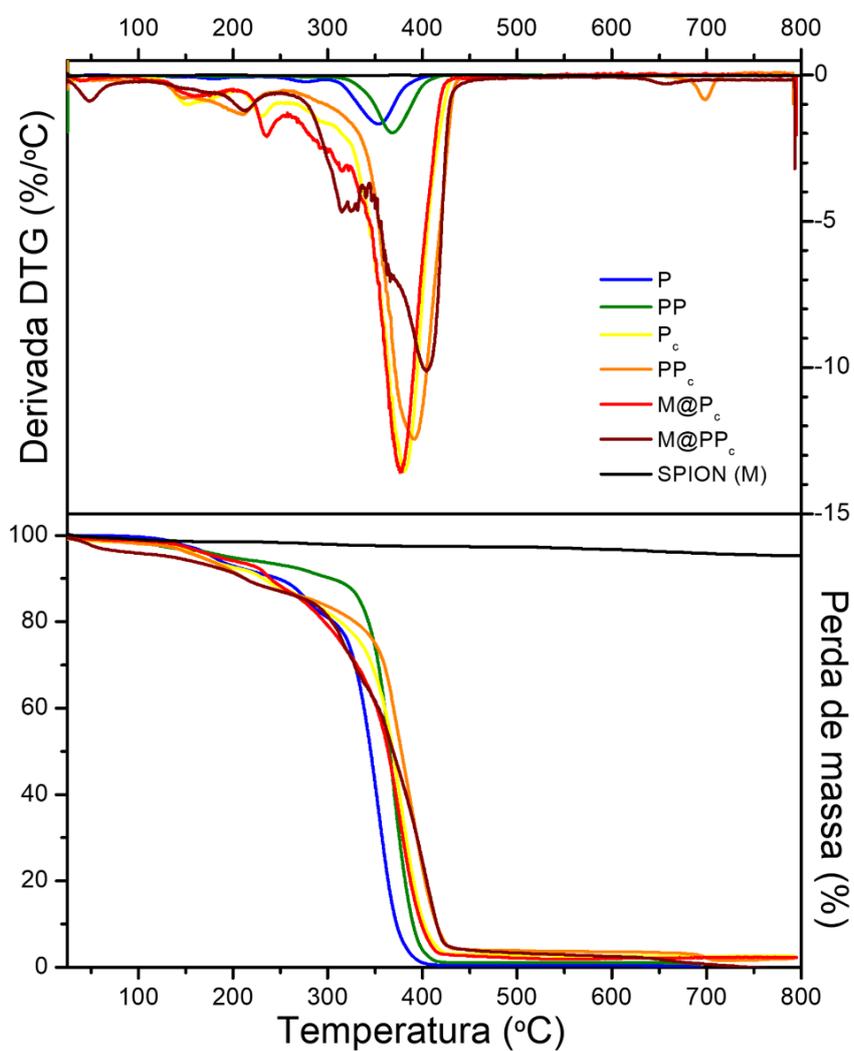
**Figura 43.** Espectros de FTIR obtidos para os nanossistemas SPION (linha preta), P (linha azul), PP (linha verde), P<sub>c</sub> (linha amarela), PP<sub>c</sub> (linha laranja), M@P<sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP<sub>c</sub> (linha vinho).



Para os nanossistemas P<sub>c</sub>, PP<sub>c</sub>, M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>, três estágios principais estão envolvidos na degradação do material. O primeiro estágio é representado por um pequeno pico localizado na faixa de 150 – 160 °C, devido à desidroxilação dos grupos OH da curcumina (VARAPRASAD *et al.*, 2019), levando a uma perda de massa de cerca de 2%. A segunda etapa ocorre na faixa de 200 – 250 °C, devido à degradação da cadeia polimérica (clivagem das ligações C-C), levando a uma perda de massa em torno de 5,0%, mais pronunciada para M@P<sub>c</sub>. O terceiro estágio, representado pela banda mais larga no gráfico DTG, corresponde ao percentual de perda de massa mais significativo no TGA, respondendo por aproximadamente 90% da massa. Este estágio ocorre dentro da faixa de temperatura de 350 – 410 °C e é atribuído ao início da cisão aleatória e à clivagem das ligações mais estáveis entre unidades que compõem a cadeia polimérica, como mencionado anteriormente para P e PP. Notavelmente, o envolvimento da curcumina

nesta etapa é evidente, pois a adição de curcumina faz com que a maior porcentagem de perda de massa se desloque para temperaturas mais altas. Os resultados apresentados corroboram outros trabalhos que avaliaram nanocompósitos de PMMA contendo curcumina (BOSCHETTO *et al.*, 2023).

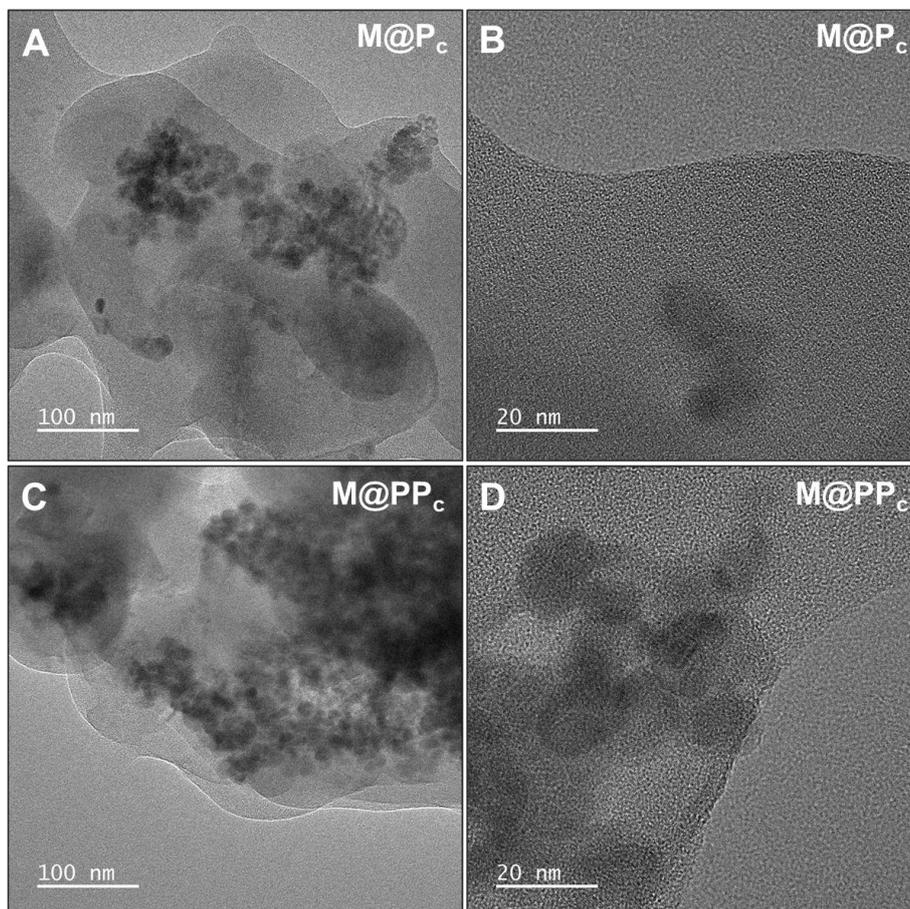
**Figura 44.** Curvas de análise termogravimétrica (TGA) e termogravimétricas derivadas (DTG) para SPION (linha preta) e os nanossistemas P (linha azul), PP (linha verde), P<sub>c</sub> (linha amarela), PP<sub>c</sub> (linha laranja), M@P<sub>c</sub> (linha vermelha), e M@PP<sub>c</sub> (linha vinho).



As imagens de MET obtidas (Figura 45) revelaram materiais amorfos ao redor de estruturas cristalinas, que são compatíveis com aglomerados de nanopartículas magnéticas no interior de estruturas poliméricas nos nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>. Não foram observadas diferenças morfológicas significativas ao comparar os dois nanossistemas, como pode ser visto nas Figura 45-A e B (M@P<sub>c</sub>) e Figura 45-C e D

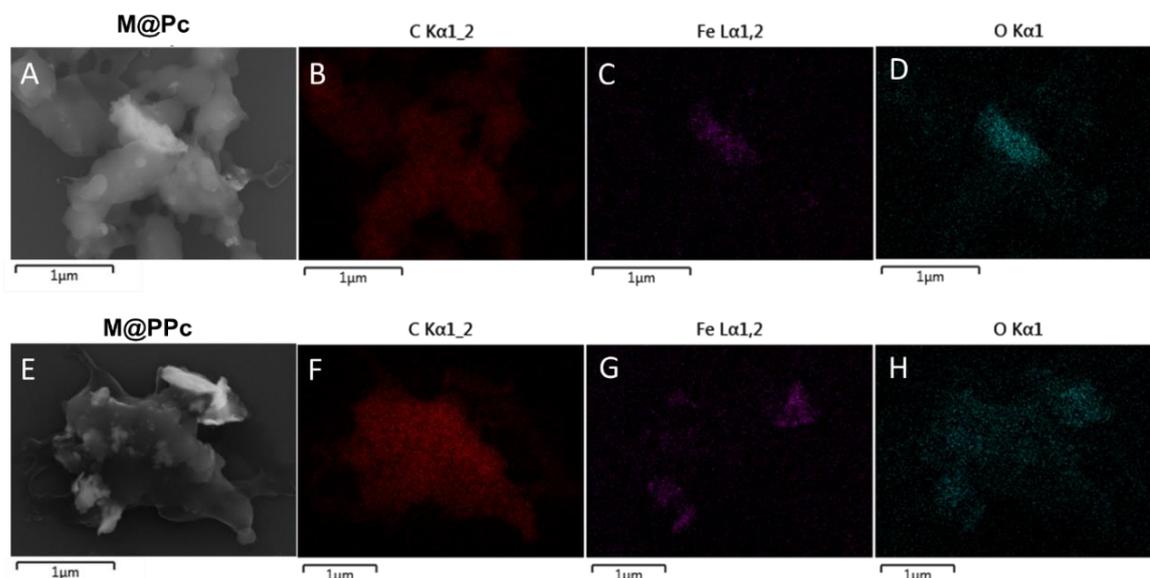
(M@PP<sub>c</sub>), pois ambos os nanossistemas apresentaram um revestimento polimérico uniforme, com formação de pequenos agregados em determinados pontos.

**Figura 45.** Imagens de MET dos nanossistemas M@P<sub>c</sub> (A - baixa magnificação e B - alta magnificação) e M@PP<sub>c</sub> (C - baixa magnificação e D - alta magnificação).



Para confirmar a presença de elementos magnéticos e poliméricos que compõem o nanossistema, os materiais M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> foram analisados usando EDS acoplado a imagens de MEV. Os resultados (Figura 46) mostraram a presença de carbono disperso ao redor do sistema, atribuídos à matriz polimérica e à presença da curcumina. Além disso, podemos visualizar a presença do elemento ferro concentrado no núcleo do sistema, assim como o elemento oxigênio, mostrando que as partículas magnéticas são efetivamente encapsuladas na estrutura do polímero (PMMA ou P(MMA-co-AA) respectivamente).

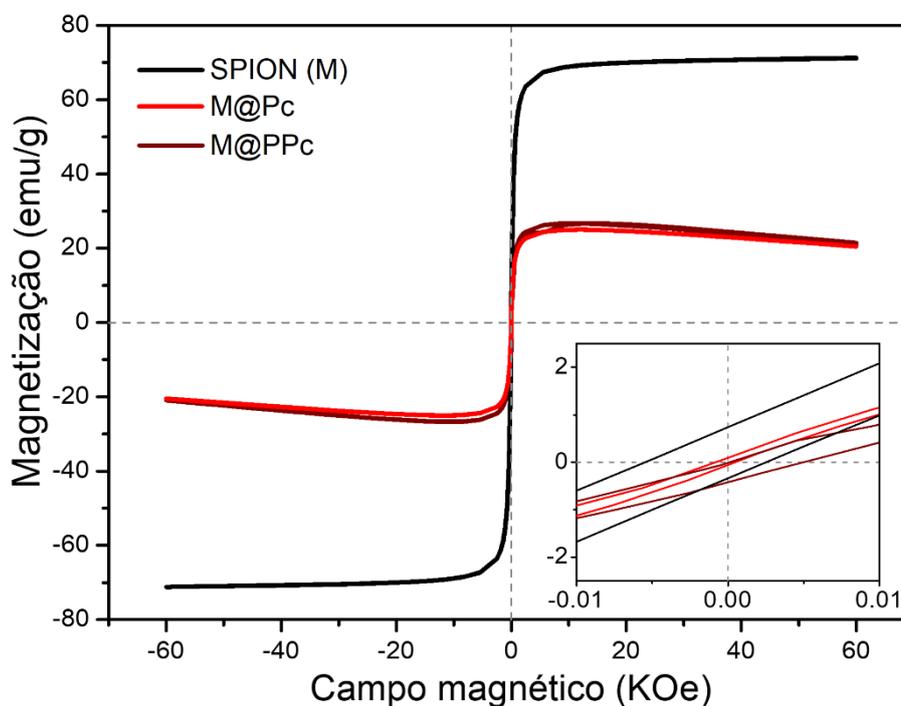
**Figura 46.** Imagens de MEV para os nanossistemas M@P<sub>c</sub> (A) e M@PP<sub>c</sub> (E) e imagens de mapeamento elemental de carbono (B e F), ferro (C e G) e oxigênio (D e H) representados nas cores vermelha, roxa e azul, respectivamente.



### 5.3.2 Validação multifuncional: propriedades magnéticas e fluorescentes

A propriedade de superparamagnetismo exibida pelos nanossistemas magnéticos é essencial para a implementação viável em biomedicina, uma vez que, ao ser removida a aplicação de um campo magnético externo, o material deve retornar às condições iniciais (FLORES-ROJAS *et al.*, 2022). Para investigar o impacto do revestimento polimérico sobre o comportamento magnético dos SPIONs, a magnetização de várias amostras foi avaliada utilizando VSM. A Figura 47 apresenta as curvas de magnetização dos nanossistemas SPION (M), M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> obtidos à temperatura ambiente, em termos da massa magnética dos materiais. É importante notar que as medições de magnetização após o encapsulamento mostram um componente diamagnético significativo. O comportamento diamagnético é caracterizado pela inclinação da curva de magnetização após a saturação. A contribuição pronunciada do componente diamagnético se deve ao baixo teor de material magnético em relação ao material polimérico na matriz híbrida. Efeitos semelhantes são apresentados na literatura (MOHAPATRA *et al.*, 2015), em compósitos com baixo teor de materiais magnéticos.

**Figura 47.** Magnetização em função do campo magnético aplicado a 300 K para amostras SPION (linha preta), M@P<sub>c</sub> (linha vermelha) e M@PP<sub>c</sub> (linha vinho). A inserção à direita mostra uma ampliação em torno do campo zero a 300 K para todas as amostras.



Nota: Para as medidas de magnetização foram empregadas massas de M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> 100 vezes maiores que a massa de SPION, para normalizar a massa magnética (teórica, baseada nas condições de síntese) dos materiais.

O gráfico de magnetização dependente do campo mostra que os nanossistemas SPION, M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> são superparamagnéticos à temperatura ambiente, pois não houve histerese detectada e tanto a remanência quanto a coercividade foram desprezíveis (LAN *et al.*, 2011). Os parâmetros magnéticos obtidos a partir da medida de magnetização podem ser observados na Tabela 17. O valor para a magnetização de saturação ( $M_s$ ) do SPION foi condizente com a composição da magnetita (SANTOS *et al.*, 2021; EMILIO *et al.*, 2015). Os valores de  $M_s$  para os nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> revelaram que, após o revestimento com a estrutura polimérica (PMMA ou P(MMA-co-AA)), a magnetização da saturação diminuiu cerca de 60% para ambos os nanossistemas em relação ao SPION. Outros autores relataram o mesmo comportamento para sistemas semelhantes, o que pode ser atribuído em grande parte à oxidação durante a polimerização, que leva à formação de alguns óxidos de ferro não magnéticos (HONG *et al.*, 2009; PARK *et al.*, 2009).

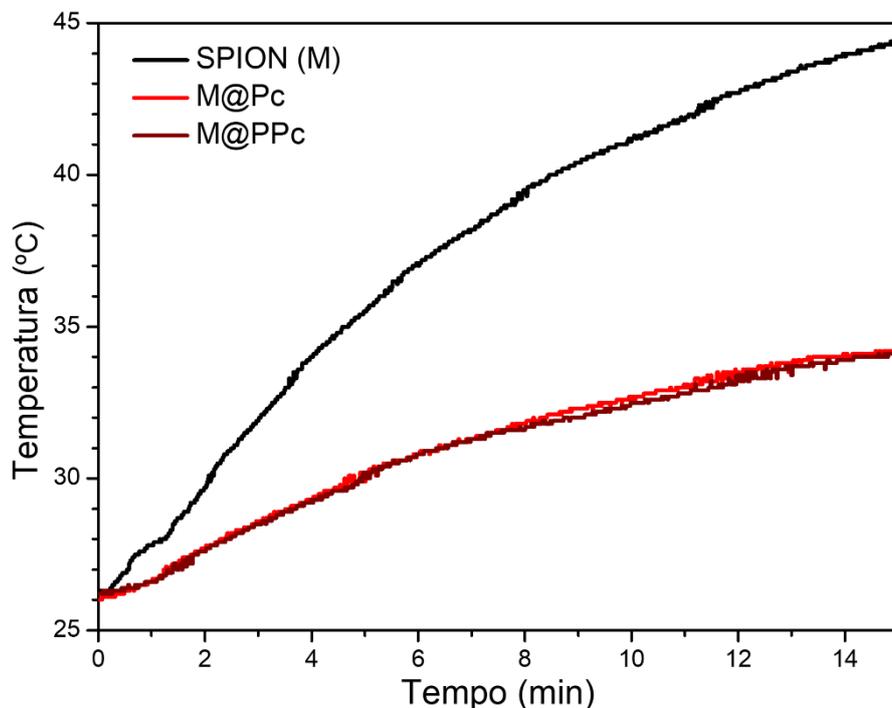
**Tabela 17.** Parâmetros magnéticos obtidos para os nanossistemas SPION, M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>.

<b>Material</b>	<b>M<sub>s</sub> (emu/g)</b>	<b>M<sub>r</sub> (emu/g)</b>	<b>H<sub>c</sub> (Oe)</b>
<b>SPION (M)</b>	71,2	0,71	5,1
<b>M@P<sub>c</sub></b>	25,1	0,05	0,92
<b>M@PP<sub>c</sub></b>	26,7	0,33	4,83

Para avaliar o potencial terapêutico por hipertermia magnética, foram obtidas as curvas de aquecimento magnético (Figura 48) para nanopartículas magnéticas puras (SPION) e nanossistemas (M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>) sob a aplicação de um campo magnético alternado. Foi realizada a linearização dos pontos das curvas obtidas na região de 2 a 3 minutos, para obter as taxas de aquecimento (°C min<sup>-1</sup>) para o cálculo da taxa de absorção específica (SAR), que expressa a potência dissipada por unidade de massa magnética. Para facilitar a comparação direta da eficiência de aquecimento de diferentes nanossistemas magnéticos, os valores de SAR foram normalizados em relação aos parâmetros extrínsecos, como amplitude e frequência de campo, para obter valores de perda de potência específica (ILP) (WILDEBOER *et al.*, 2014).

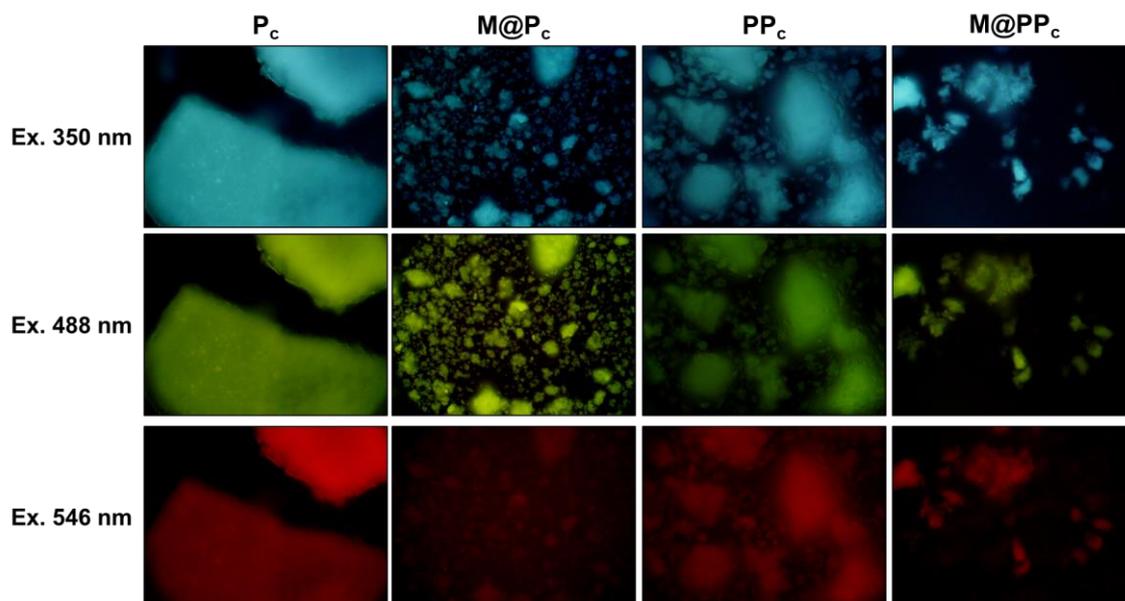
Valores de ILP variando de 0,2 a 3,1 nHm<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> foram relatados para ferrofluidos comerciais (KALLUMADIL *et al.*, 2009). No presente estudo, os valores de ILP obtidos para os nanossistemas foram iguais a 0,32, 0,13 e 0,14 nHm<sup>2</sup> kg<sup>-1</sup> para as amostras SPION, M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>, respectivamente. Esses resultados se alinham bem com os dados experimentais relatados por outros pesquisadores que investigaram sistemas semelhantes (SAVVA *et al.*, 2013; MEDFORD *et al.*, 2014) e são consistentes com as medições obtidas usando VSM. É importante ressaltar que a incorporação de nanopartículas magnéticas na matriz polimérica restringe sua relaxação induzida pelo movimento browniano (SAVVA *et al.*, 2013), o que explica os menores valores de ILP observados para os nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>.

**Figura 48.** Curvas de temperatura em função do tempo obtidas para os nanossistemas SPION (linha preta), M@Pc (linha vermelha) e M@PPc (linha vinho) (concentração de 0,9, 90 e 90 mg/mL, respectivamente) sob aplicação de um campo de 596 (200 A) Oe e 226 KHz.



Uma vez confirmadas as propriedades magnéticas, com potencial para diagnóstico por imagem (RMN ou microCT) e tratamento por hipertermia magnética, investigou-se a propriedade de fluorescência, com potencial para rastreamento celular. A curcumina é conhecida por ser um material fluorescente com máximo de emissão em  $\lambda_{em} = 550$  nm (EtOH), correspondendo à região verde do espectro eletromagnético (CHIGNELL *et al.*, 1994). Para confirmar a fluorescência do material em diferentes comprimentos de onda, os materiais em pó foram analisados por microscopia de fluorescência, como pode ser observado na Figura 49. Os nanossistemas exibiram emissão de fluorescência nas regiões do azul, verde e vermelho do espectro eletromagnético, o que é consistente com o amplo espectro de absorção da curcumina incorporada em uma matriz polimérica, como já observado no caso de polímeros acrílicos em massa contendo curcumina (MARTINS *et al.*, 2023). Vale ressaltar que a intensidade da fluorescência em diferentes condições de exposição à luz não pode ser comparada, pois o tempo de exposição para cada amostra não foi fixado, simulando uma rotina de geração de imagens em laboratório.

**Figura 49.** Microscopia de fluorescência dos nanossistemas em pó, com excitação em diferentes regiões do espectro eletromagnético: azul ( $\lambda_{\text{ex}} = 350 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 380 \text{ nm}$ ), verde ( $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 520 \text{ nm}$ ) e vermelho ( $\lambda_{\text{ex}} = 546 \text{ nm}$ ;  $\lambda_{\text{em}} = 620 \text{ nm}$ ).

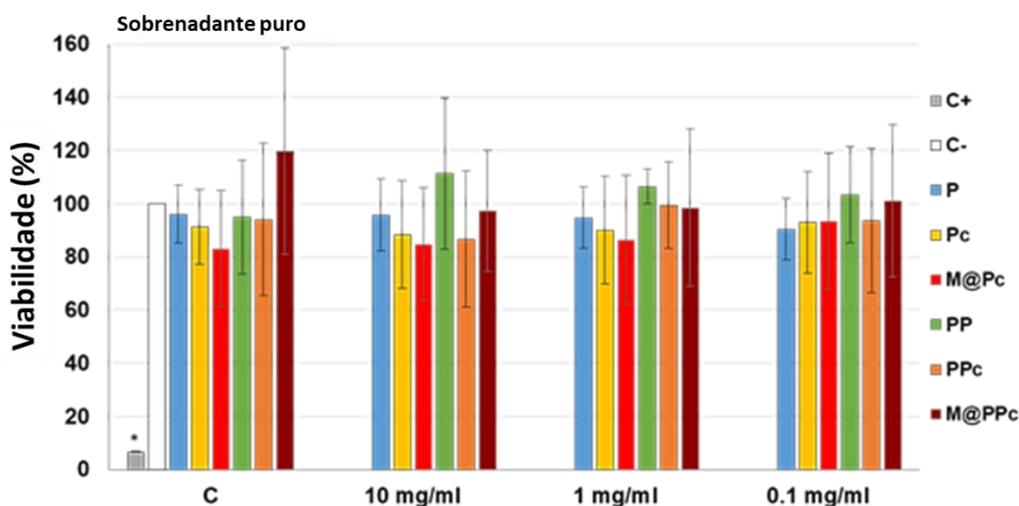


### 5.3.3 Ensaios biológicos

#### 5.3.3.1 Ensaios de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos nanossistemas, a linhagem celular SAOS2 foi incubada por 24h com diferentes concentrações de materiais (10,0/1,0/0,1 mg/mL). Observações por microscopia óptica exibiram aglomerados visíveis em maiores concentrações e aglomerados maiores em  $M@P_c$  e  $PP_c$ , mas não foram observadas alterações morfológicas nas células após a exposição (Anexo . O ensaio de MTT foi realizado após exposição para avaliar a viabilidade celular. Como pode ser observado na Figura 50, os resultados revelaram que não foram observadas alterações significativas após a exposição celular aos nanossistemas.

**Figura 50.** Ensaio de viabilidade celular (conversão do formazan após exposição ao MTT) com diferentes concentrações dos nanossistemas (10; 1,0 e 0,1 mg/mL). A análise é o resultado da média  $\pm$  SD de três experimentos independentes.



Desde o início do século passado, a FDA considera que as partículas de óxido de ferro são materiais seguros e biocompatíveis, com diversos usos aprovados em técnicas de diagnóstico por imagem, como MRI (MALHOTRA *et al.*, 2020). No entanto, com o desenvolvimento da nanotecnologia, novas regras estão sendo estabelecidas devido às diferentes características e comportamento biológico dos materiais em nanoescala (WU *et al.*, 2022). Estudos recentes indicam como a citotoxicidade pode estar diretamente correlacionada não apenas com a concentração, mas também com o tamanho, morfologia e revestimento das nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas (SPIONs) (VANGIJZEGEM *et al.*, 2023).

Nesse cenário, os materiais produzidos podem ser considerados seguros em altas concentrações, já que não afetaram a viabilidade celular nem a morfologia celular. Essa condição, assegurada adicionalmente pela encapsulação polimérica dos materiais, é muito importante para o desenvolvimento de futuras aplicações biotecnológicas, pois permite o uso de concentrações mais altas de SPIONs que podem estimular um efeito melhor e seletivo sob condições de hipertermia dependente de campo magnético, direcionado seletivamente às células cancerígenas, com menor efeito sobre as células saudáveis (THEODOSIOU *et al.*, 2022).

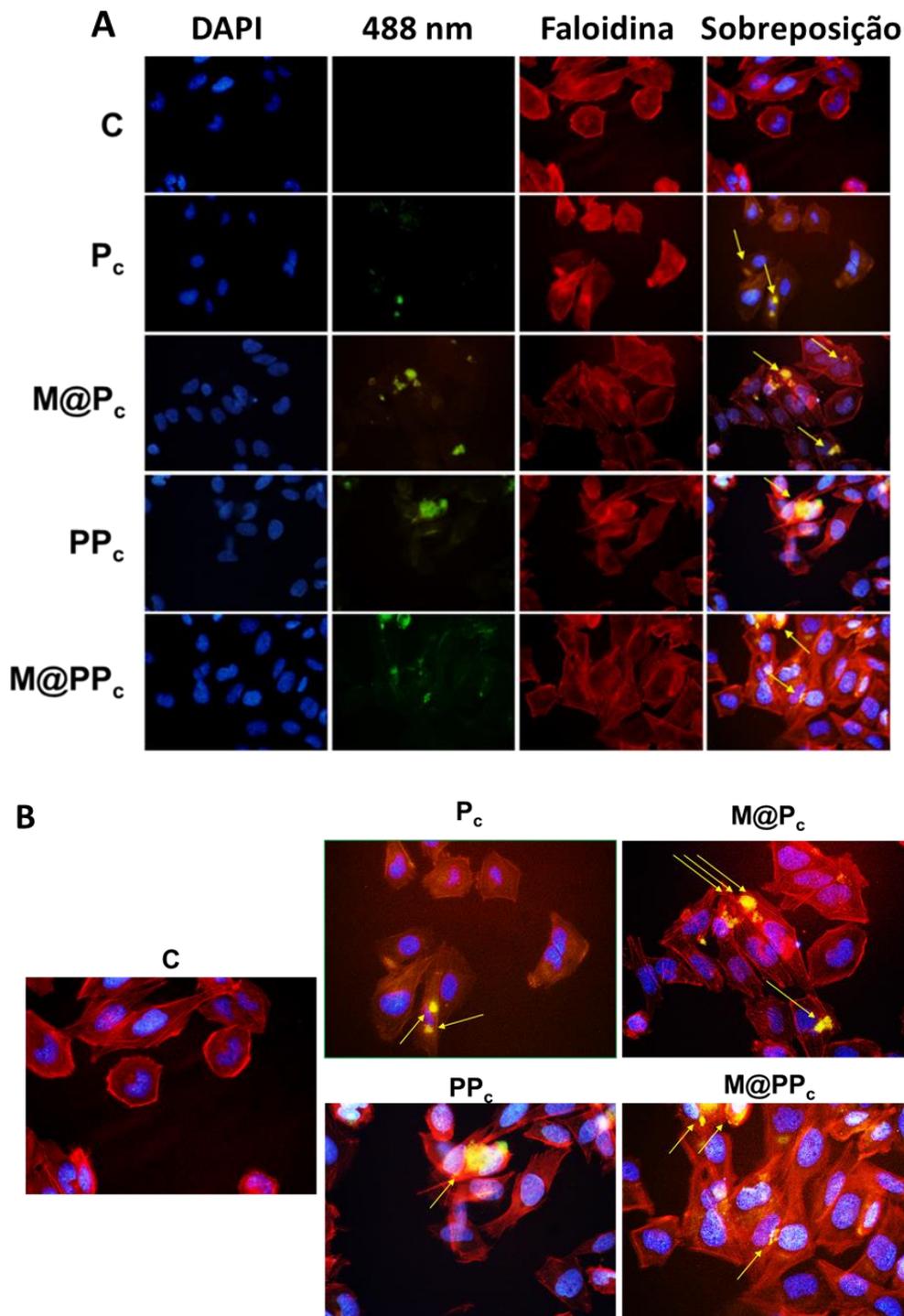
### 5.3.3.2 *Ensaio de internalização*

Para verificar se os nanossistemas foram internalizados com sucesso pelas células, uma micrografia fluorescente foi gerada após 24 h de exposição aos nanossistemas. A Figura 51 apresenta imagens obtidas com diferentes comprimentos de onda de excitação. A coloração DAPI marca os núcleos em azul; a coloração de faloidina marca as fibras de actina do citoesqueleto em vermelho; e os nanossistemas apresentam fluorescência verde, devido à presença da curcumina. Na última coluna do painel na Figura 51-A (baixa ampliação) e na Figura 51-B (alta ampliação) são geradas imagens sobrepostas e a seta amarela indica os materiais internalizados nas células. Todos os materiais foram internalizados pelas células, mas nem todas as células foram marcadas.

Todos os nanossistemas contendo curcumina ( $P_c$ ,  $PP_c$ ,  $M@P_c$  e  $M@PP_c$ ) apresentaram boa internalização celular, apresentando um sinal intracelular intenso, apesar da exposição relativamente baixa à dose dos nanossistemas. A intensidade do sinal pode ser atribuída à encapsulação polimérica da curcumina em PMMA e P(MMA-co-AA), que mantém a curcumina aprisionada no sistema, aumentando sua fotoestabilidade. Uma estratégia semelhante foi utilizada por ZAKARIA *et al.* (2022), que sintetizaram nanocápsulas de PLGA carregadas com curcumina revestidas com cloreto de poli(dialildimetilamônio) (PDDA) para manter a curcumina dentro do PLGA, a fim de detectar dopamina. O desenvolvimento de nanossistemas contendo curcumina/curcuminoides vem crescendo nos últimos anos, devido à facilidade, rapidez e baixo custo de produção, aliado às diversas possibilidades de aplicação (GABR *et al.*, 2022). Um exemplo é o trabalho publicado por GELARDI *et al.* (2022), em que foi desenvolvida uma sonda fluorescente à base de curcumina com potencial uso no diagnóstico precoce do glioblastoma ou em operações neurocirúrgicas de precisão.

No entanto, os benefícios da curcumina não se limitam ao diagnóstico. Vários trabalhos mostram as propriedades anticancerígenas deste composto sozinho ou em combinação com agentes quimioterápicos. SRIVASTAVA *et al.* (2019) mostraram efeitos antiproliferativos do tratamento com curcumina em quatro linhagens celulares cancerígenas (A549, HCT116, MCF7 e A375). GHASEMI *et al.* (2019) estudaram os efeitos da curcumina em células de câncer cervical, mostrando como esse composto pode estimular vias antiproliferativas inibindo o crescimento das células tumorais quando utilizado em combinação com quimioterápicos como o 5-fluorouracil.

**Figura 51.** Ensaio de internalização celular (SAOS-2 em lamínulas) - micrografia representativa. **A-** Coloração dos núcleos em azul (DAPI, primeira coluna), dos nanossistemas em verde ( $\lambda_{ex} = 488$  nm, segunda coluna) e o citoesqueleto em vermelho (coloração de faloidina, terceira coluna). A última coluna da Figura A (baixa ampliação) e a Figura **B** (alta ampliação) mostram imagens mescladas, com setas amarelas indicando a internalização dos nanossistemas.



A curcumina apresenta propriedades fluorescentes com grande potencial para uso em diagnósticos, bem como uso como fotossensibilizador já estabelecidos em terapia fotodinâmica. Adicionalmente, a combinação das propriedades fluorescentes da curcumina com as propriedades magnéticas das nanopartículas magnéticas sugere que os nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> são excelentes candidatos para uso teranóstico duplo, combinando imagem fluorescente/magnética (MRI) com as terapias fotodinâmicas e hipertermia magnética em uma única dose.

## 5.4 Conclusão

Este capítulo teve como propósito principal a síntese e a caracterização de nanossistemas inovadores voltados para aplicações teranósticas, fundamentados em propriedades magnéticas e fluorescentes. A partir de diferentes técnicas de caracterização, as propriedades fluorescentes dos nanossistemas P<sub>c</sub> e PP<sub>c</sub> foram confirmadas, assim como as propriedades bifuncionais (magnéticas e fluorescentes) dos nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub>. A ausência de citotoxicidade, associada às propriedades magnéticas e à fluorescência observada após a internalização celular, abre perspectivas para aplicação em diagnósticos por imagem (RMN e microCT). Ademais, os nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> revelaram potencial de aplicação em medicina nanoteranóstica, permitindo diagnósticos duplos com base em propriedades magnéticas e fluorescentes, sendo candidatos promissores para a aplicação em tratamentos, como hipertermia magnética e terapia fotodinâmica.

## 5.5 Cooperações técnicas e produções científicas

### 5.5.1 Colaborações

O presente Capítulo foi desenvolvido com as seguintes colaborações:

- 1) **Lys Mangia** – Doutora do Programa de Engenharia Química (PEQ/COPPE/UFRJ): síntese e caracterizações das nanopartículas poliméricas.
- 2) **Juliana Goulart** e **Bruna França** – Doutoradas do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ/IQ/UFRJ): ensaios de caracterização fotoquímicas das nanopartículas poliméricas fluorescentes.

### 5.5.2 Orientações

O presente Capítulo desdobrou nas seguintes orientações/supervisões:

- 1) **Heshiley Correa** – Graduanda do Programa de Engenharia de Materiais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), realizou Iniciação Científica sob minha orientação, desdobrando no projeto *Design of magnetic and fluorescent nanostructures for life science applications as cellular markers*, apresentado na modalidade pôster (virtual) no XIX Brazil MRS Meeting (SBPMat 2021).
- 2) **Gabriel Agostinho** – Graduando do Programa de Nanotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/Xerém), defendeu os Projetos de Introdução à Pesquisa em Nanotecnologia, sob minha orientação: (área de Química) “Síntese de nanopartículas poliméricas magnético-fluorescentes” e (área de Biologia) “Avaliação da bioacumulação de nanopartículas multifuncionais em modelo in vivo” apresentados em 2019.
- 3) **Pietro Colonna** – Graduando do Programa de Nanotecnologia da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ/Xerém), defendeu os Projetos de Introdução à Pesquisa em Nanotecnologia, sob minha orientação: (área de Química) “Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas fluorescentes por meio de polimerização via miniemulsão em presença de curcuminoides sintéticos” e (área de Materiais) “Obtenção de nanopartículas magnéticas de óxido de ferro e avaliação das propriedades físico-químicas dos nanomateriais” apresentados, respectivamente em 2021 e 2023.

### 5.5.3 Produções científicas

Este capítulo resultou na apresentação do seguinte trabalho em congresso:

- 1) Desenvolvimento de nanoestruturas com propriedades fluorescentes e magnéticas para aplicações biotecnológicas, apresentado na modalidade oral no XXII Congresso Brasileiro de Engenharia Química (COBEQ 2018).

# 6 CAPÍTULO VI

## Validação do Potencial Teranóstico de Nanopartículas Superparamagnéticas em Modelos Tumoriais de Esferoides Celulares

O que importa se o tempo passou?	Aonde quer que eu vá	Tenho amor e muita sorte
O que importa se vai demorar?	Sou feliz, alegre e forte	Aonde quer que eu vá
O que importa se o dia chegou?	Tenho amor e muita sorte	
O que importa se nunca virá?	Aonde quer que eu vá	Sou feliz, alegre e forte
O que importa se alguém falou?		Tenho amor e sorte
O que importa se ninguém falar?	O que importa se o pneu furou?	Aonde quer que eu vá
	O que importa se vai decolar?	Sou feliz, alegre e forte
O que importa é aqui e agora	O que importa se escorregou?	Tenho amor e muita sorte
Toda hora é hora	O que importa é se levantar	Aonde quer que eu vá
Enquanto eu posso estar	O que importa se a noite	
O que importa é ser aqui e agora	esfriou?	Sou feliz, alegre e forte
Toda hora é hora	O que importa é saber amar	Tenho amor e sorte
Enquanto eu posso estar		Aonde quer que eu vá
	O estado contente da mente	Sou feliz, alegre e forte
Sou feliz, alegre e forte	Depende somente de acreditar	Tenho amor e muita sorte
Tenho amor e sorte	O estado contente da mente	Aonde quer que eu vá
Aonde quer que eu vá	Depende da gente, é só	
Sou feliz, alegre e forte	acreditar	Sou feliz, alegre e forte
Tenho amor e muita sorte		Tenho amor e sorte
Aonde quer que eu vá	Sou feliz, alegre e forte	Aonde quer que eu vá
	Tenho amor e sorte	Sou feliz, alegre e forte
Sou feliz, alegre e forte	Aonde quer que eu vá	Tenho amor e muita sorte
Tenho amor e sorte	Sou feliz, alegre e forte	Aonde quer que eu vá

Feliz, Alegre e Forte (Marisa Monte)

## 6.1 Contextualização

O óxido de ferro é um material promissor para uso combinado no diagnóstico e tratamento (teranóstico) de doenças como o câncer (FARINHA *et al.*, 2021). O diagnóstico precoce e correto de patologias é essencial para o tratamento adequado do paciente, principalmente nas doenças oncológicas. As nanopartículas magnéticas representam uma tecnologia de alta sensibilidade e boa resolução temporal e espacial sob um sinal de fundo de tecido biológico fraco, além de uma meia-vida na circulação sanguínea longa. Estas características são funcionais para a detecção da doença em um estágio inicial e monitoramento do tratamento, aprimorando várias técnicas diagnósticas não invasivas, como tomografia computadorizada (TC) e ressonância magnética funcional (RMN) (YANG *et al.*, 2022).

A TC baseia-se na densidade característica de cada tecido anatômico exposto a uma fonte de raios X para detectar lesões, coágulos ou tumores. Devido ao alto coeficiente de absorção de raio X, as partículas magnéticas estão sendo largamente usadas como agentes de contraste para gerar uma imagem de contraste aprimorado, reduzindo os efeitos colaterais dos agentes tradicionais, como o iodo (YANG *et al.*, 2022). Já as técnicas de RMN englobam tecnologias de imagem baseadas em um gradiente de campo gerado por ímãs supercondutores que permite alta resolução e penetração tecidual profunda, porém com baixa sensibilidade e especificidade.

Por fim, as propriedades de partículas magnéticas podem ser exploradas na área de diagnóstico molecular, para detecção e sucessiva separação rápida e barata de células ou outras moléculas específicas, como DNA e RNA, purificação de proteínas e quando comparada a métodos de detecção mais demorados e custosos, como a reação em cadeia da polimerase - PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction*) (FARINHA *et al.*, 2021).

As propriedades das nanopartículas magnéticas derivam fortemente do seu tamanho e morfologia, que influenciam, além das características físico-químicas, também a estabilidade e dispersabilidade. Por esta razão, estas características podem ser ajustadas, dependendo da aplicação. Para o diagnóstico em biomedicina, as nanopartículas magnéticas foram usadas com sucesso em medicina vascular, em que foram usadas para distinguir entre AVC isquêmico ou hemorrágico e entender o lúmen de uma variedade de *stents* endovasculares e cardiopatias (WEGNER *et al.*, 2021). O tamanho das nanopartículas magnéticas permite alcançar tecidos que apresentam barreiras, como o

encéfalo, permitindo a o diagnóstico de doenças desmielinizantes ou patologias como demência e Alzheimer (VALLABANI; SINGH, 2018; YANG *et al.*, 2022). Além disso, o aprimoramento do contraste no imageamento com nanopartículas magnéticas permite determinar mais precisamente o estágio de neoplasias e o diagnóstico de metástases, aplicações que se tornam mais interessantes porque os sinais das nanopartículas magnéticas são obtidos exclusivamente de SPIONs, sem efeito de estrutura anatômica, mesmo em tecidos de difícil diagnóstico, como pulmões e ossos (VOGEL *et al.*, 2019; YANG *et al.*, 2022).

As propriedades das nanopartículas de óxido de ferro de responder a um campo magnético mostra potencial para o tratamento baseado em hipertermia magnética. Esta é uma técnica pouco invasiva e que pode ser aplicada no tratamento do câncer, baseada na entrega de materiais magnéticos no interior do tecido tumoral. As células tumorais possuem um metabolismo mais ativo em comparação com as células saudáveis e, portanto, a internalização de partículas nas células cancerosas é facilitada (GUPTA; SHARMA, 2019). Além disso, segundo o princípio da hipertermia magnética, a aplicação do campo magnético alternado gera um aumento de temperatura, que destrói seletivamente as células tumorais, mais sensíveis a altas temperaturas. A vantagem da hipertermia magnética, comparada com a hipertermia do corpo inteiro (invasiva, quando aquece o sangue de forma extracorpórea, ou não invasiva, quando é usada irradiação RF ou IR, ar ou cera quentes) é a possibilidade de tratamento de tumores profundos (BRÜNINGK *et al.*, 2020). Desta forma, é possível realizar uma hipertermia regional localizada na área ocupada pelo tumor, que minimiza os efeitos colaterais, concentrando a máxima eficiência do tratamento na região tumoral, com um mecanismo que destrói o câncer de dentro para fora.

A literatura mostra um aumento de relatos da eficiência deste tratamento, principalmente contra o glioblastoma multiforme, um tumor cerebral extremamente agressivo e com baixa taxa de sobrevivência. Estudos pré-clínicos mostraram resultados na redução de tumor e no aumento da eficácia da ação de quimioterapia convencional, aumentando a permeabilidade da barreira hematoencefálica e, desta forma, o aporte de fármacos no tumor, resultando em um tratamento sinérgico (GUPTA; SHARMA, 2019; HA *et al.*, 2019; PHUNG *et al.*, 2019).

Na pesquisa do câncer, cuja agressividade muitas vezes se deve à interação da célula com sua própria matriz, a maioria dos estudos faz uso de cultivo com métodos bidimensionais (2D) em monocamada, que não consegue reproduzir a complexidade do microambiente celular. Por isso, métodos novos e aprimorados que implementam técnicas de cultura de células tridimensionais (3D), nas quais as células não se desenvolvem em monocamada, mas em três dimensões, para que o fenótipo e a fisiologia celular sejam menos alterados e reproduzam assim o microambiente tumoral de forma aprimorada. Estes estudos estão gerando evidências convincentes de que experimentos muito mais avançados podem ser realizados, resultando em informações valiosas. Um desses modelos é o esferoide celular, que, comparado com os modelos celulares 2D, permite o estudo mais aprimorado de interações célula a célula, das características do tumor, do perfil metabólico tumoral e da avaliação de eficiência de medicamentos (JENSEN; TENG, 2020).

Com base no exposto, no presente capítulo foi avaliado o efeito da hipertermia em células de osteossarcoma SAOS2 cultivadas em um modelo esferoide 3D com dimensões aproximadas de 600  $\mu\text{m}$  de diâmetro e expostas a diferentes concentrações de nanopartículas de ferro (100, 300 e 500  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente) por 24 horas. Complementarmente, foi avaliado o potencial diagnóstico promovido pelas SPIONs internalizadas nos esferoides celulares.

## **6.2 Materiais e métodos**

### **6.2.1 Síntese de nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs)**

A síntese dos SPIONs foi descrita e discutida no Capítulo IV. No presente capítulo foram empregadas as nanopartículas magnéticas recobertas com amino-silano (NPM-NH<sub>2</sub>).

### **6.2.2 Comparação entre ressonância magnética nuclear e microCT**

Com o intuito de avaliar o potencial dos SPIONs na geração de imagens para diagnóstico, foram comparadas as técnicas de imageamento por ressonância magnética (RM) e tomografia computadorizada (TC).

Para tal, foram preparados fantasmas<sup>6</sup> com diferentes concentrações de SPIONs, para avaliar a qualidade das imagens geradas por cada técnica e a respectiva sensibilidade.

### **6.2.2.1 Ressonância magnética nuclear**

As nanopartículas magnéticas (NPM\_NH<sub>2</sub>) foram ressuspensas em água e ácido oleico nas concentrações de 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> e 10<sup>-3</sup> mg.mL<sup>-1</sup>, visando a simular o comportamento do nanomaterial magnético em condições biológicas ricas em água ou em gordura. As amostras foram dispostas em porta-amostras, junto aos respectivos brancos e analisadas no equipamento *Bruker* (modelo *Avance Neo*, Alemanha) 500 MHz, utilizando sonda de imagem *MIC 500S2/AS Body*.

Inicialmente, foram necessários alguns ajustes para sintonizar o sinal da amostra com o espectrômetro. O processo é conhecido como *tuning* e *matching*, em que o primeiro ajusta a frequência de ressonância, enquanto o segundo ajusta a potência refletida. Posteriormente, para aumentar a homogeneidade do campo estático, executou-se um processo conhecido como *shimming*. As medidas de relaxação longitudinal (T1) e transversal (T2) foram obtidas pelos protocolos recuperação-inversão e CPMG (*Carr-Purcell-Meiboom-Gill*), respectivamente. No primeiro caso, foi utilizado um pulso de 180 graus, seguido de outro de 90 para cada ponto. Já para a CPMG, um pulso de 90 e outros de 180 para refocalização e boleto dos dados.

Para aquisição das imagens, utilizou-se o protocolo *Flash*, uma sequência baseada em eco por gradiente. Com isso, foi possível gerar imagens tanto pesadas em T1 quanto em T2\*. Para o primeiro caso, utilizou-se 5,3 s como tempo de repetição (TR) e 2,3 s como o tempo entre ecos (TE). Por outro lado, para as imagens pesadas em T2\* utilizou-se TR = 400 ms e TE = 60 ms. Para ambos os casos, foi utilizado FOV (*field of view*) = 10x10 mm.

### **6.2.2.2 MicroCT**

Foram preparados corpos de prova (fantomas) à base de silicone líquido, que foi solidificado utilizando 3% do catalisador reticulante à base de organoestanho em tetraestilicato por 60 minutos à temperatura ambiente, utilizando como molde placas

---

<sup>6</sup>Um fantoma de imagem é um objeto físico usado para controle de qualidade e calibração em técnicas de imagem médica, como raios-X, tomografias computadorizadas e ressonância magnética. Os fantasmas são projetados para simular o corpo e os órgãos humanos e ajudam a garantir que o equipamento de imagem médica esteja funcionando corretamente, produzindo imagens precisas e consistentes.

de 96 poços e de 24 poços, adquirindo-se corpos de prova de diferentes diâmetros. As concentrações de SPIONs testadas nos corpos de prova foram  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  mg.mL<sup>-1</sup>. As medidas foram realizadas no microtomógrafo *Bruker* (modelo *Skyscan 1275*, Bélgica), com um ângulo de 180°, energia de 50 kV e corrente de 100 µA. A resolução utilizada foi de 10 µM. As amostras foram reconstruídas utilizando o software *NRecon* e os volumes foram visualizados com o software *CTVox*.

### **6.2.3 Cultura de células 3D**

A linhagem celular de osteossarcoma humano (SAOS2) mantida em nitrogênio líquido foi descongelada e expandida em atmosfera umidificada (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C), usando meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 1% de Penicilina/Estreptomicina (PS – 10.000 unidades/mL de penicilina e 10.000 µg/mL de estreptomicina, *Gibco*) em frascos de cultura *Corning*. Para realizar a cultura de células 3D, foram usadas placas de fundo em U de 96 poços (*Corning*), previamente revestidas com uma fina camada de 1% de agarose ultrapura (*Sigma-Aldrich*). Em seguida, 200 µL de suspensão de células ressuspensas em meio DMEM de alta glicose suplementado com 10% SFB e 1% PS, contendo 10000 células foram plaqueadas em cada poço. As células foram incubadas por 72 horas em uma atmosfera umidificada com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. O crescimento, a forma e a morfologia dos esferoides foram monitoradas no microscópio óptico invertido *Olympus* (modelo *CKX41*, Japão) para garantir a reprodutibilidade da morfologia e dimensão dos esferoides.

### **6.2.4 Exposição dos esferoides aos SPIONs (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>)**

Após 72 horas, foram formados esferoides 3D de células. Em seguida, o cultivo celular foi exposto a diferentes concentrações de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> (100, 300 e 500 µg/mL, respectivamente) e incubado por 24 h em atmosfera umidificada com 5% CO<sub>2</sub> a 37 °C. As micrografias ópticas foram realizadas no microscópio invertido *Olympus* (modelo *CKX41*, Japão).

### **6.2.5 Aplicação de campo magnético alternado**

Após 24 h de exposição celular às nanopartículas de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>, foi aplicado um campo magnético de 596 Oe e frequência de 226 KHz por 10 minutos cada ciclo nas condições descritas a seguir. Após 24 horas da exposição das células às nanopartículas, o campo magnético foi aplicado uma vez (T1), duas vezes (T2) ou três vezes (T3) no tempo

de 10 minutos de aplicação de campo seguido de 30 minutos de repouso a 5% CO<sub>2</sub> e 37 °C em atmosfera umidificada. Além disso, para estudar o efeito cumulativo da hipertermia magnética, foi aplicado um campo de mais 10 minutos 48 horas após a exposição às partículas (T4) e um ciclo de campo adicional de 10 minutos, 72 horas após a exposição às partículas (T5).

## **6.2.6 Fixação e pós-fixação de esferoides**

Para análise fluorescente, as amostras foram lavadas e fixadas por 10 minutos com PFA 4%. Para a análise por microCT, as amostras foram subsequentemente embebidas em parafina. Para aumentar a resolução da análise microCT e para a análise da microscopia de transmissão, as células foram fixadas com solução de *Karnovsky* (2,5% de glutaraldeído, 2,5% de formaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M, pH 7,2). Após a fixação, as amostras foram pós-fixadas por 30 minutos com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, desidratadas por imersão em uma série graduada de álcool (50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) e finalmente infiltradas em resina epóxi.

## **6.2.7 Análise de esferoides**

### **6.2.7.1 Análise por microCT**

Os esferoides foram escaneados em um dispositivo de microCT de alta resolução *Bruker* (modelo *Skyscan 1172*, Bélgica), usando um tempo total de digitalização de cerca de 1 h em um tamanho de voxel de 13,04 µm, 24 kV, 529 µA, 180° de rotação, um passo de rotação de 0,25°, exposição de 2000 ms. A correção do endurecimento do feixe e os limites de contraste ideais com base nos testes iniciais de varredura e reconstrução foram determinados de acordo com as instruções do fabricante.

### **6.2.7.2 Análise de fluorescência**

As amostras foram fixadas com PFA 4% e marcadas 30 minutos com solução DAPI 1 mg/mL em PBS. As imagens foram obtidas usando um microscópio fluorescente *Zeiss* (modelo *Axio Plan II*, Alemanha), com  $\lambda_{ex} = 359$  nm e  $\lambda_{em} = 457$  nm.

### **6.2.7.3 Análise de MET**

As amostras foram fixadas em solução de *Karnovsky* e pós -fixadas com tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% por trinta minutos. Após isso, as células foram lavadas com tampão *Cacodilato* por três vezes, desidratadas em soluções aquosas

de etanol numa escala crescente de (50%, 70%, 80%, 90%, 95% e 100%) e embebidas em resina epóxi. Cortes ultrafinos (40 – 100 nm) foram analisados em um microscópio eletrônico *Tecnai* (modelo *Spirit*, EUA) 120Kv no CENABIO (UFRJ).

#### **6.2.7.4 Quantificação de SPIONs internalizados**

As partículas internalizadas pelos esferoides de osteossarcoma foram quantificadas por medidas de absorção correspondente ao  $Fe^{3+}$ , após procedimento de abertura com ácido clorídrico. A abertura da amostra de esferoides foi realizada adicionando 150  $\mu$ L de HCl 20% para cada esferoide e sucessivamente 50  $\mu$ L da solução de  $KMnO_4$  1 mg/mL. Para realização da curva de calibração para quantificação de NPMs, foram preparadas ressuspensões de SPIONs em diferentes concentrações (0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 e 1,0 mg/mL), sendo submetidas ao mesmo tratamento com HCl e  $KMnO_4$ . As medidas para estimar a concentração média de NPMs por esferoide foram realizadas por absorvância (355 nm) usando um espectrofotômetro UV-vis *Agilent* (modelo *BioTek Sinergy2*, EUA).

### **6.3 Resultados e Discussão**

#### **6.3.1 Comparação entre RMN e microCT**

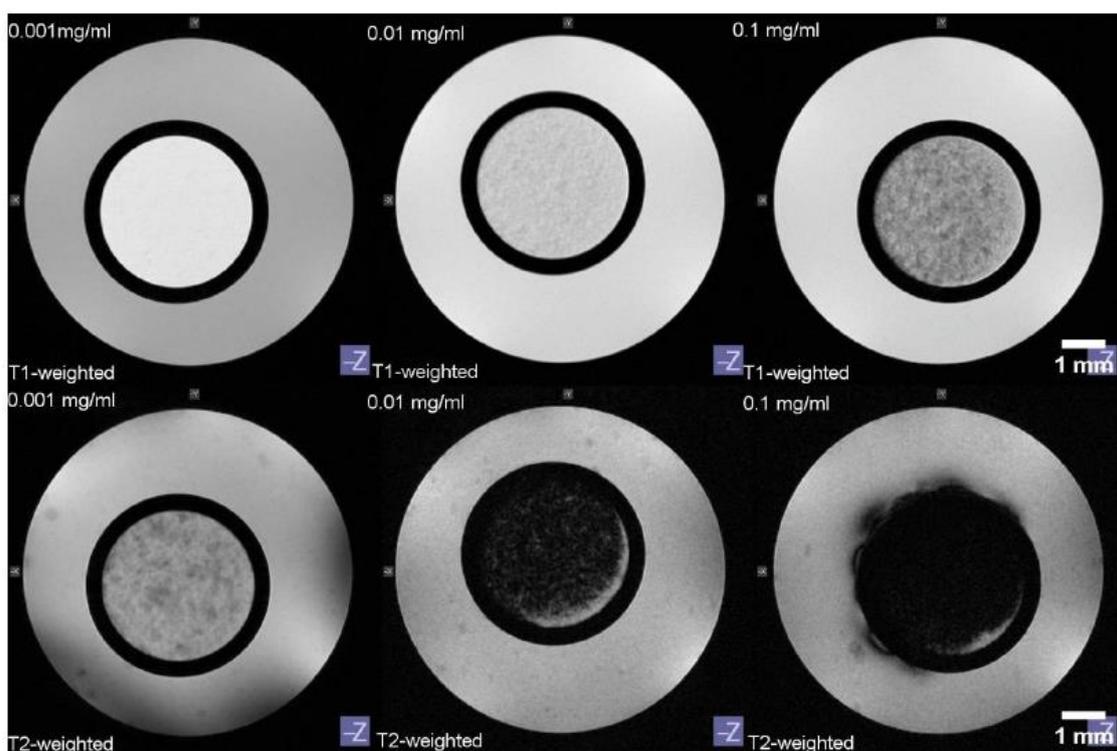
##### **6.3.1.1 Imageamento por Ressonância Magnética Nuclear**

Para avaliar a qualidade de contrastes de imagens promovido pelas NPMs em medidas de RMN foram preparadas suspensões de SPIONs com diferentes concentrações em água e ácido oleico. Vale ressaltar que as imagens geradas por essa técnica não permitem a observação direta das NPMs, mas o efeito que elas promovem no entorno em que se encontram. Por isso, além das imagens geradas, serão apresentados dados quantitativos correlacionados à relaxação magnética dos meios (água e ácido oleico) puros e em presença das nanopartículas.

Inicialmente foram geradas imagens das NPMs dispersas em água (Figura 52). Para isto, foi utilizado um porta-amostras, que consiste em dois tubos de vidro concêntricos, em que no tubo externo era disposto o meio puro (água) e no tubo interno era disposta a amostra a ser avaliada (NPMs dispersas em água). Desta forma é possível comparar o efeito de modificação de contraste obtido sob uma imagem gerada nas mesmas condições simultaneamente, simplificando o tratamento de dados e facilitando a

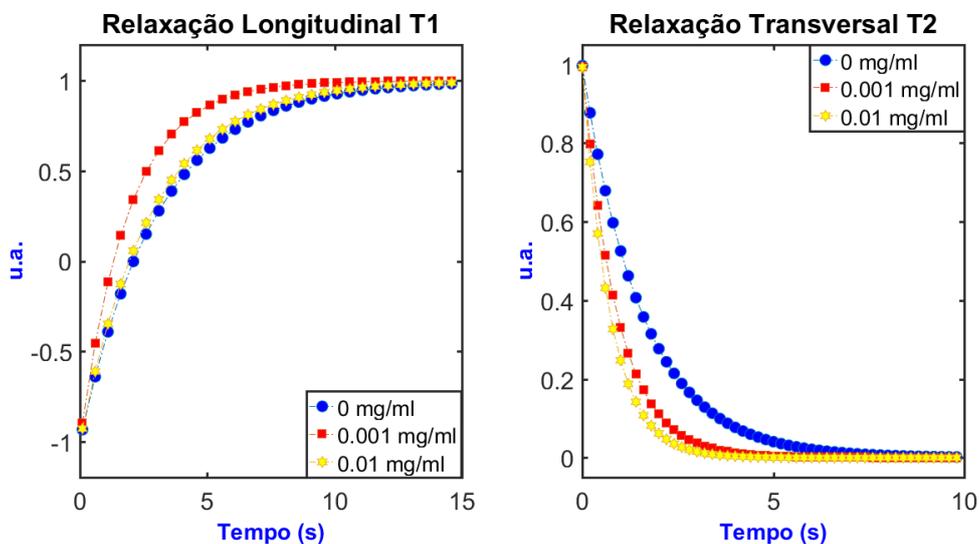
avaliação dos efeitos. Portanto, avaliando a Figura 52, é possível observar que as imagens obtidas em T1 são mais homogêneas e com menos artefatos (ruídos) que as imagens obtidas em T2, o que tem relação direta com a aquisição de imagens e ao fato de T1 ser maior que T2, de forma que a imagem em T1 é obtida enquanto a dinâmica de relaxação longitudinal ainda está ocorrendo, enquanto a imagem em T2 é obtida em sistema praticamente estacionário, após relaxação transversal já ter finalizado (MCROBBIE *et al.*, 2007).

**Figura 52.** Imagens obtidas por RMN pesadas em T1 e em T2, avaliando o efeito de NPMs dispersas em água



Considerando as melhores imagens obtidas em T1 (Figura 52 – linha superior), nota-se que maiores contrastes e menores ruídos estão diretamente correlacionados a menores concentrações de NPMs. Sendo assim, medidas de relaxação (Figura 53), foram realizadas para as menores concentrações (0,001 e 0,01 mg/mL) em comparação com a água pura. A curva para relaxação T2 (Figura 53-B) apresenta uma maior constante de decaimento para maiores concentrações, enquanto para relaxação T1 (Figura 53-A) a tendência não é observada. A Tabela 18 apresenta os valores das constantes obtidas pelas medidas de relaxação.

**Figura 53.** Medidas de relaxação T1 obtida por inversão-recuperação (A) e medidas de relaxação T2 obtida por intermédio do protocolo CPMG (B) para a NPMs dispersas em água.



**Tabela 18.** Valores das constantes obtidas pelas medidas de relaxação das NPMs em água

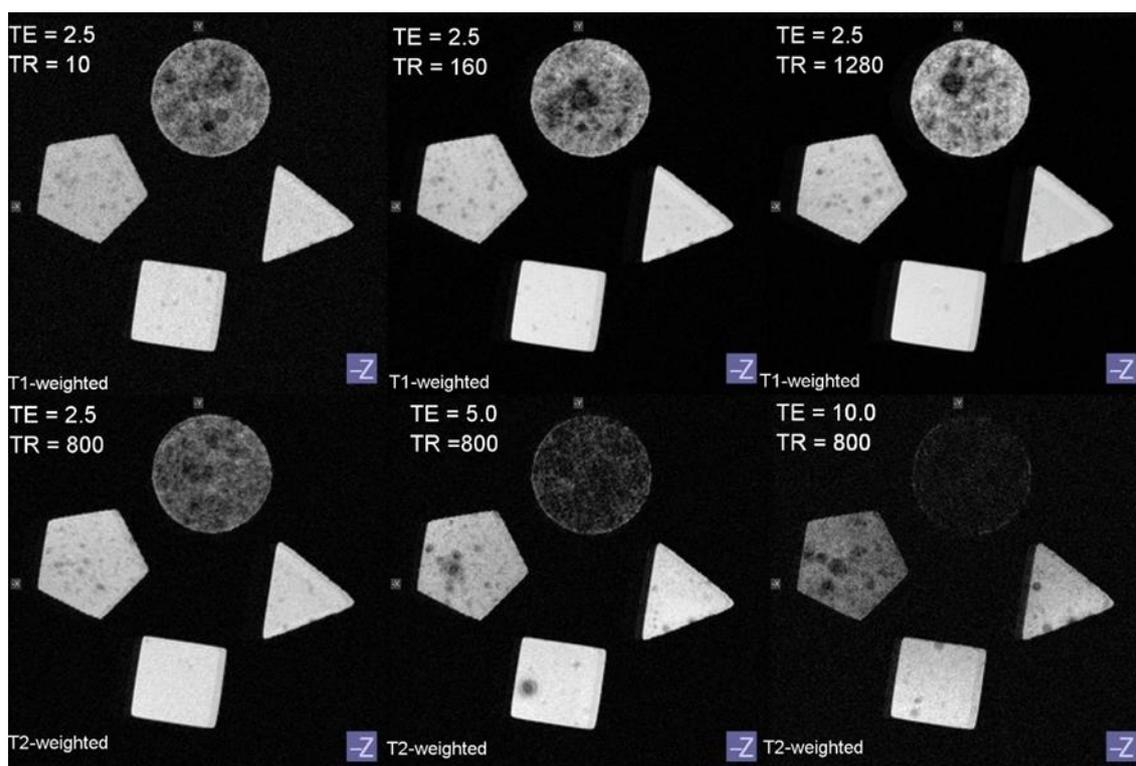
Concentração (mg/mL)	T1 (s)	T2 (s)
0,000	3,04	1,52
0,001	1,89	0,91
0,010	2,79	0,72

Com base nos resultados apresentados, a presença de NPMs contribui com a redução do tempo de relaxação da água, o que era esperado porque as nanopartículas magnéticas apresentam relaxação rápida (ZHAO et al., 2020). As imagens obtidas apresentam características que corroboram as medidas de relaxação.

Em um segundo momento, foram geradas imagens de NPMs dispersas em ácido oleico (Figura 54), simulando tecidos vivos ricos em gordura. Neste caso, foi empregado um porta-amostras, cilíndrico de resina, contendo 4 estruturas internas com geometrias distintas, onde foram introduzidas amostras com diferentes concentrações de NPMs (triângulo – ácido oleico (AO) puro, quadrado – 0,001 mg/mL de NPM em AO, pentágono – 0,01 mg/mL de NPM em AO, círculo – 0,1 mg/mL de NPM em AO). Este porta-amostras permitiu comparar diferentes concentrações simultaneamente e ainda

variar especificações de aquisição de imagens. Assim como observado para a água, as amostras obtidas em T1 apresentaram menos artefatos do que as obtidas em T2. No entanto, as amostras obtidas em T2\* apresentaram maiores contrastes, quando em presença de NPMs, e este contraste aumentou com o aumento de concentração das nanoestruturas magnéticas.

**Figura 54.** Imagens obtidas por RMN pesadas em T1 e em T2, avaliando o efeito de NPMs dispersas em ácido oleico.

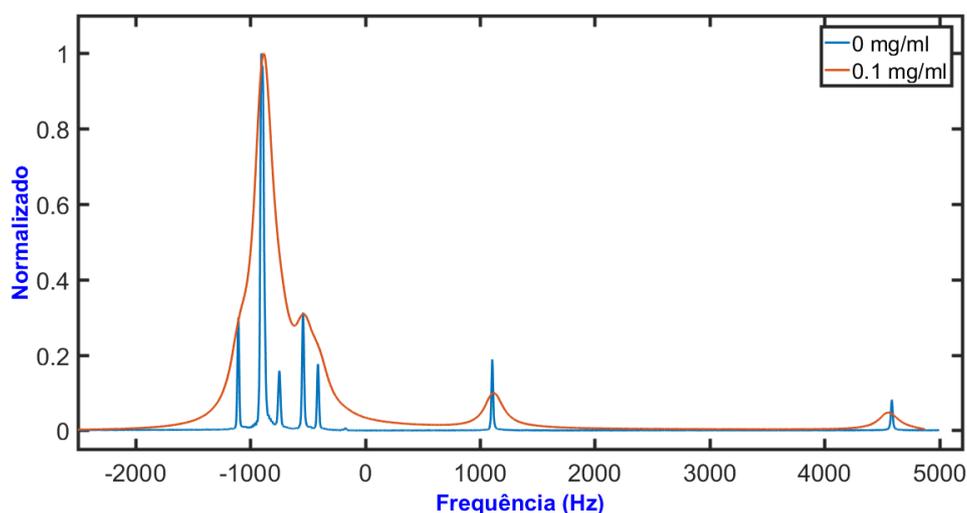


Nota: triângulo – ácido oleico (AO) puro, quadrado – 0,001 mg/mL de NPM em AO, pentágono – 0,01 mg/mL de NPM em AO, círculo – 0,1 mg/mL de NPM em AO.

As amostras de baixa concentração ( $10^{-3}$  e  $10^{-2}$  mg/mL) de NPM em ácido oleico não apresentaram mudanças perceptíveis nas medidas de relaxação e imagem. Por outro lado, a amostra com a concentração de 0,1 mg/mL apresentou melhores resultados de contraste e foi avaliada em maiores detalhes quanto à relaxação. Em todas as amostras em ácido oleico, não foram observadas mudanças no tempo de relaxação em T1 ou T2, por influência da NPM (em quaisquer concentrações); por isso, não foi gerada a curva de relaxação neste caso, mas sim o espectro de RMN (Figura 55) para a amostra que apresentou melhor resultado frente ao branco (ácido oleico puro). O espectro apresentado mostra claramente o alargamento dos picos do ácido oleico, por influência da presença

de NPMs, o que, via de regra, poderia ser atribuído à redução do tempo de relaxação induzidos pelas mesmas. No entanto, como não foram observadas alterações significativas nos tempos de relaxação do ácido oleico na presença de NPMs, o incremento de contraste nas imagens relacionados ao incremento de carga de NPMs podem ser atribuídos a uma distorção de campo magnético induzido pela presença das mesmas. É possível que a maior viscosidade do ácido oleico tenha influenciado a relaxação das NPMs, de forma que o efeito na relaxação tenha se tornado desprezível.

**Figura 55.** Espectro normalizado do ácido oleico “puro” e com 0,1 mg/ml de nanopartículas magnéticas



Em linhas gerais, foi observado que a presença de NPMs reduz o tempo de relaxação da água e não afeta significativamente a relaxação de óleos (simulado pelo ácido oleico). No caso da água, menores concentrações de NPM resultaram em melhores qualidades de contraste, enquanto no caso de óleos o oposto foi observado (melhores imagens:  $[NPM]_{\text{água}}=10^{-3}$  mg/mL em T1 e  $[NPM]_{\text{óleo}}=10^{-1}$  mg/mL em T2\*). Este resultado de comportamento antagônico, da qualidade de contraste de imagem por RMN, entre água e óleo na presença de NPMs é positivo, considerando que o diagnóstico pode ser favorecido por baixas concentrações de NPMs quando estas estejam localizadas em tecidos ricos em água. No entanto, o diagnóstico pode ser dificultado no caso em que seja interessante que as NPMs estejam concentradas em tecidos ricos em gordura. De qualquer forma, estes resultados ajudam a pensar no *design* dos nanomateriais, com modificações de superfície hidrofílica ou hidrofóbica, a depender da aplicação de interesse.

### 6.3.1.2 *Imageamento por microCT*

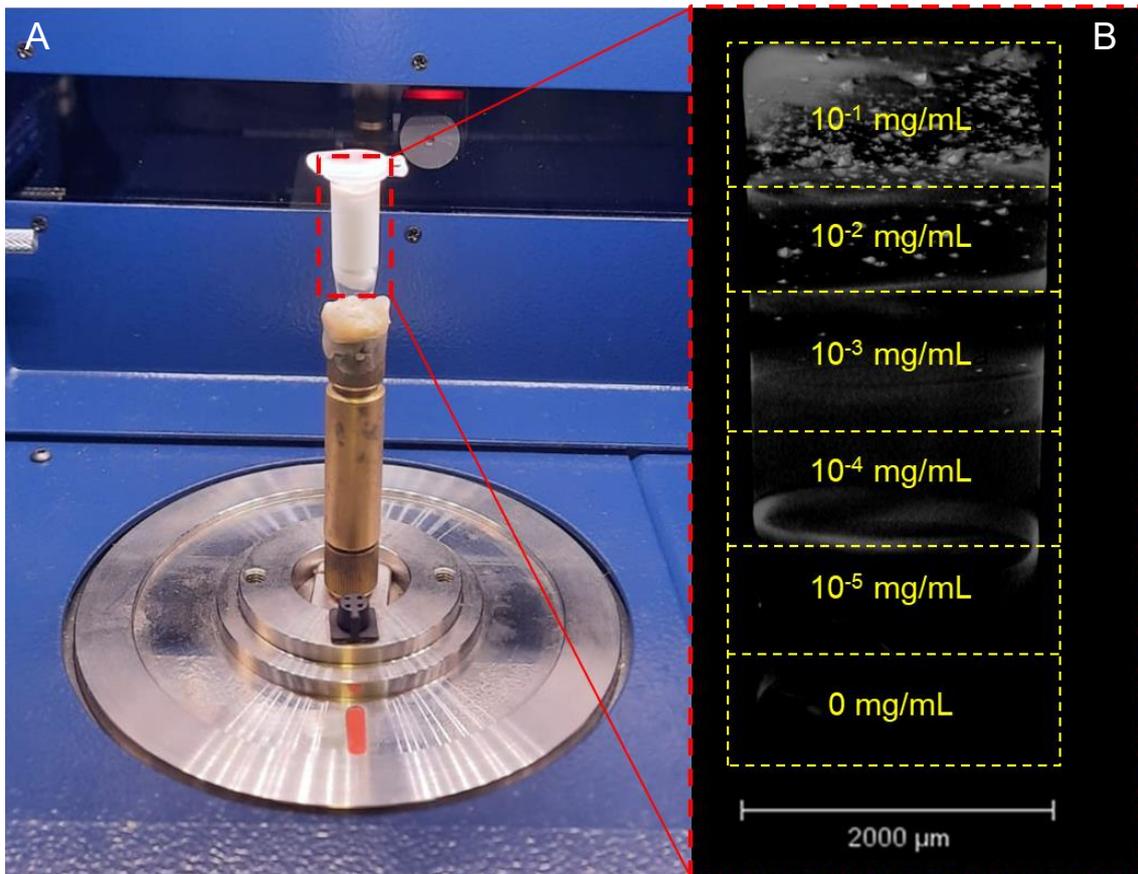
Para avaliar o uso potencial das NPM como material contrastante em tomografia computadorizada em organismos vivos, foram desenvolvidos fantasmas à base de silicone, contendo concentrações crescentes das NPM, a fim de definir o limite de detecção das NPMs por microCT. Diferente das medidas de RMN, em que as amostras foram preparadas em meio líquido, na microCT o fantoma deve ser sólido, dada a forma como a imagem é gerada. A imagem por microCT consiste em várias projeções de imagens de raios X que são captadas girando a amostra e posteriormente sobrepondo as imagens. Portanto, se a amostra fosse líquida, as nanopartículas iriam se mover, gerando ruídos nas imagens.

Foram preparados corpos de prova de 6,5 mm de diâmetro com diferentes concentrações de NPMs em silicone ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-4}$  e  $10^{-5}$  mg/mL). Estes corpos de prova foram fatiados com altura de cerca de 2 mm de altura e sobrepostos, gerando um fantoma com concentrações crescentes de NPM. Este fantoma foi submetido a medidas de microCT (Figura 56-A), gerando imagens (Figura 56-B) de contrastes comparativos, uma vez que foi aplicado o mesmo tratamento em todo o fantoma. Com estes resultados, foi possível observar que há um sinal discreto a partir da concentração de  $10^{-4}$  mg/mL de NPMs, com o aparecimento de grandes aglomerados de NPM na maior concentração (0,1 mg/mL). Vale destacar que, diferentemente da técnica de RMN, em que as NPMs não geram sinal direto, mas perturbam o sinal gerado pelo meio, no caso da TC o sinal medido é relacionado diretamente às NPMs, uma vez que nesta técnica o sinal está relacionado a medidas de difração.

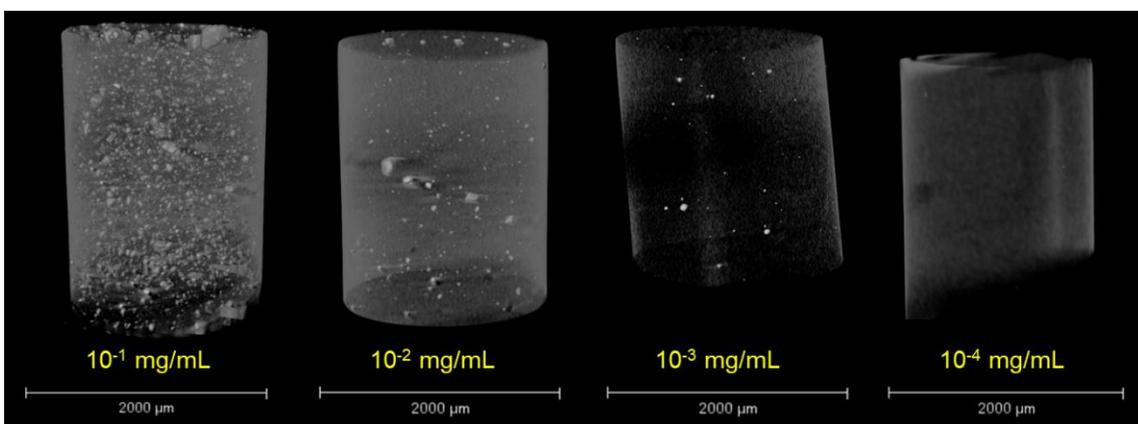
Como esperado, o contraste por microCT aumentou com o incremento de concentração de NPMs. No entanto, para determinar o limite de detecção da técnica empregando NPMs, as quatro amostras que apresentaram maiores sinais foram refeitas como corpos de prova individuais, agora com dimensões maiores (15,6 mm de diâmetro e cerca de 30 mm de altura). Estas amostras foram analisadas individualmente, assim como um corpo de prova com as mesmas dimensões, mas preparado apenas com silicone (branco). Imagens destes corpos de prova foram geradas e tratadas, descontando o sinal do branco, como apresentadas na Figura 57. É possível observar que a concentração mínima detectável por microCT foi de  $10^{-4}$  mg/mL e que nesta concentração as NPMs encontravam-se mais bem dispersas, de forma que o sinal do fantoma foi homogêneo. Em concentrações superiores a  $10^{-4}$  mg/mL ocorreu contraste significativo, mas não

uniforme, devido à formação de aglomerados. Estes resultados reforçam a proposta de uma aplicação de NPMs sítio-dirigidas, de forma a aumentar a concentração de NPMs em uma região específica de interesse, o que pode amplificar a qualidade do sinal.

**Figura 56.** Distribuição das NPMs em corpos de prova de silicone. A) Corpo de prova geral sem contraste e B) corpo de prova com contraste, realçando as diferentes concentrações de NPMs.



**Figura 57.** Dispersão de NPMs com diferentes concentrações em fantasmas de silicone.



### **6.3.1.3 Considerações comparativas entre técnicas de RMN e microCT**

Os resultados apresentados referentes à qualidade de imageamento por RMN e microCT, na presença de NPMs, mostrou que ambas as técnicas podem ser aplicadas para diagnóstico por imagem, aplicando NPMs como agentes de contraste, tendo cada técnica sua particularidade e necessidade de ajuste.

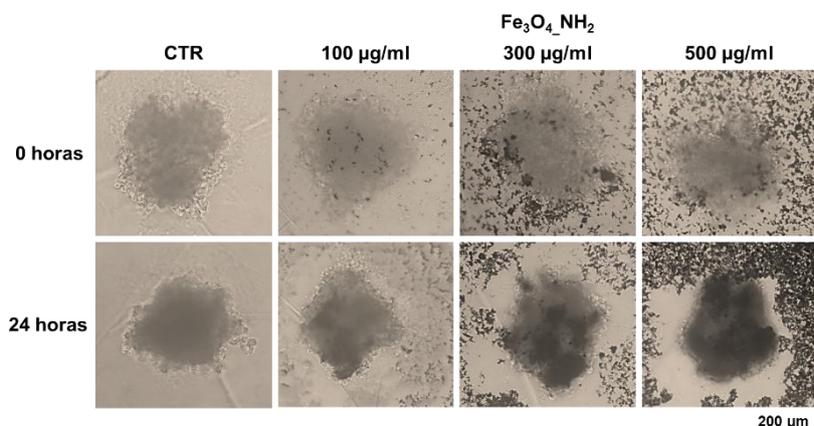
Os fantomas avaliados neste trabalho mostraram que imagens por RMN apresentaram melhores contrastes para concentrações de NPM de  $10^{-3}$  mg/mL, pesados em T1 no caso de ambientes aquosos, e de  $10^{-1}$  mg/mL, pesados em T2\* no caso de ambientes oleosos. Já as imagens obtidas por microCT apresentaram sensibilidade de  $10^{-4}$  mg/mL. RAHN *et al.* (2016) apresentaram um estudo comparativo entre a sensibilidade de imagens obtidas por RMN e microCT empregando fantomas contendo nanocompósitos magnéticos e obtiveram faixa de sensibilidades compartilhada de 0,6 mg/mL, limitadas por microCT, e 1,4 mg/ml, limitado por RMN. Estes dados corroboram os obtidos no presente trabalho, indicando que as imagens por microCT tendem a apresentar maior sensibilidade e maior faixa de aplicação, já que em concentrações maiores não provocaram distorções nas imagens, mas apenas aumento de contraste e/ou identificação de aglomerados.

Vale ressaltar que a qualidade das imagens não dependeu apenas da concentração de NPMs, mas também do volume avaliado. Nesse contexto, os estudos aqui apresentados constituem bons parâmetros para o avanço em avaliações de imagens geradas na presença de NPMs, além de apresentarem uma prova de conceito substancial para o uso dessas NPMs em diagnóstico por imagem.

### **6.3.2 Interação de NPMs com esferoides 3D**

Visando a evoluir a avaliação do uso tanto diagnóstico quanto terapêutico de NPMs, foi utilizado o modelo *in vitro* de esferoides celulares, que mimetizam organismos vivos. Preliminarmente, para avaliar a interação das nanopartículas com os modelos celulares 3D, micrografias foram realizadas por microscopia óptica (Figura 58), empregando diferentes concentrações de NPMs. Os resultados mostram uma interação das partículas com os esferoides dependente da dose e do tempo. Além disso, foi observado que todos os esferoides apresentaram tamanhos similares, com um diâmetro aproximado de 600  $\mu$ m, garantindo a reprodutibilidade dos resultados posteriores.

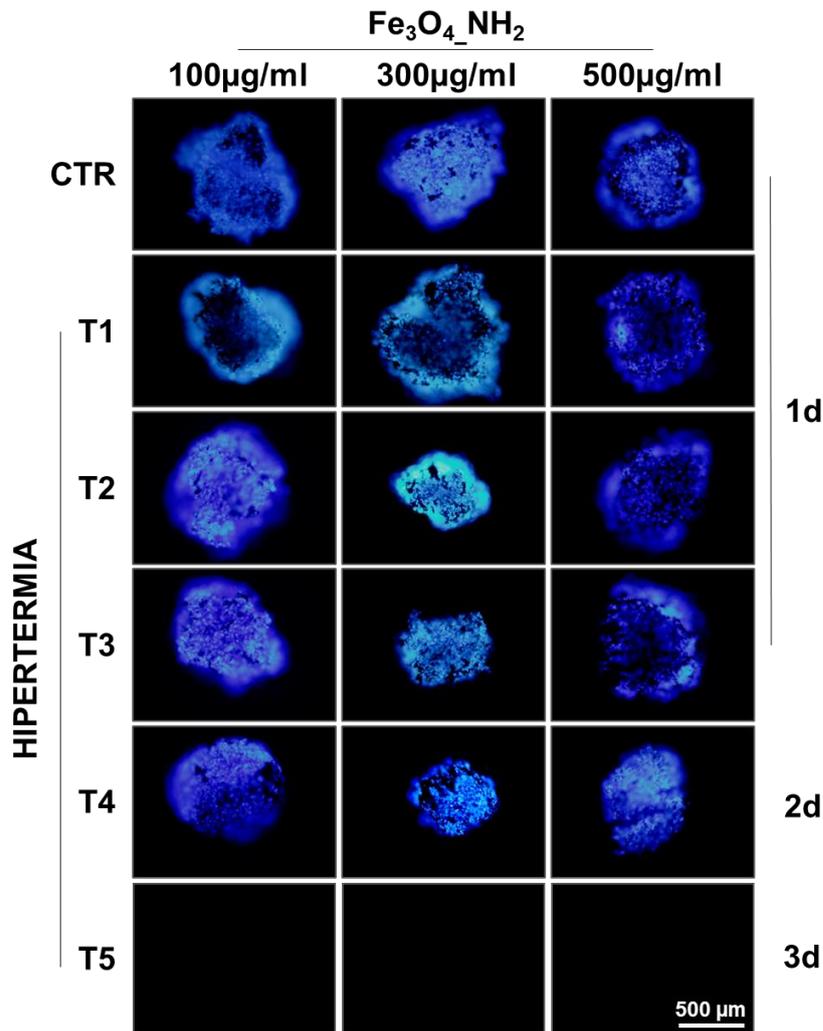
**Figura 58.** Interação de esferoides após 0h e 24h de exposição às NPMs em diferentes concentrações (100, 300 e 500 µg/mL).



### 6.3.3 Efeito morfológico após aplicação de campo magnético: potencial terapêutico de NPMs

Após internalização de NPMs em esferoides tumorais (SAOS2), estes foram submetidos à aplicação de campo magnético alternado em cinco ciclos de 10 min de aplicação de campo (protocolo detalhado definido na Seção 6.2.5). Para avaliar se a aplicação de campo magnético pode ocasionar modificações morfológicas nos esferoides, foram obtidas micrografias usando microscopia de fluorescência após a coloração nuclear com DAPI. As imagens representativas (Figura 59) mostraram uma redução de tamanho de esferoide a partir do segundo ciclo de exposição de campo magnético, nas doses de 300 µg/mL e 500 µg/mL. Contudo, o melhor efeito de redução de tamanho foi observado na concentração de exposição de 300 µg/mL. Os esferoides expostos a 500 µg/mL de NPMs apresentaram rachaduras (observação em campo claro) não observadas nas demais condições. Vale destacar que não foram obtidas imagens referentes ao tempo 5 de exposição, dada a destruição total da integridade do esferoide após 5 ciclos de exposição ao campo magnético (condição de maior concentração se desintegrou no momento de aplicação de campo e os dois casos de concentrações inferiores desintegraram no momento de processamento dos esferoides para marcação nuclear).

**Figura 59.** Efeito da exposição cumulativa do campo magnético aos esferoides.



A escolha de trabalhar com modelo de esferoide para avaliar os efeitos cumulativos do campo magnético após exposição às nanopartículas de óxido de ferro tem crescido na pesquisa contra o câncer, não apenas pelas vantagens que este modelo mostra na reprodução da doença, mas também na qualidade dos resultados na previsão do tratamento da doença *in vivo*. BRÜNINGK *et al.* (2020) mostraram que a sensibilidade dos esferoides ao calor era significativamente menor quando comparada a cultivo em monocamada. O estudo mostrou que os modelos 3D apresentaram uma resposta diferente à radiação ou hipertermia não presentes em ensaios com cultivo 2D, sugerindo que a hipertermia afeta as células independentemente de seu estado de proliferação, ao contrário da radiação, que mata principalmente células em divisão. Este apontamento corrobora o

incremento significativo de concentração de NPMs empregado no estudo 3D, frente ao estudo 2D (Capítulo IV).

As partículas de óxido de ferro com tamanho nanométrico apresentam, além das propriedades superparamagnéticas desejadas, uma vantagem farmacocinética, mostrando uma melhor difusão e distribuição e sendo menos suscetíveis à captura por macrófagos, sucessiva opsonização e remoção com acúmulo no fígado, baço e medula óssea e geração de EROs (espécies reativas de oxigênio). Embora reduzidos nas NPMs quando comparado a outras nanopartículas, esses efeitos ainda estão presentes e podem ser contornados com o revestimento das partículas em moléculas orgânicas (como polímeros ou lipídios), para reduzir a liberação de íons metálicos em quantidades tóxicas, com a dupla vantagem de permitir uma funcionalização da molécula, que pode aumentar a especificidade, além da biocompatibilidade. Desta forma, é criado um sistema híbrido que combina a segurança das moléculas orgânicas com as propriedades magnéticas fornecidas pelas partículas inorgânicas (FARINHA *et al.*, 2021). Esta estratégia foi abordada no Capítulo V.

Neste contexto, é preciso refletir sobre a quantidade de partículas necessárias para obter o efeito terapêutico desejado, evitando efeitos adversos. Os resultados apresentados mostram como ciclos repetidos de campo magnético potencializam os efeitos sem necessidade de novas exposições a nanopartículas. Nesta discussão, é importante considerar também o tipo de aplicação desejada. Neste sentido, uma partícula que possa ser usada, em uma mesma aplicação, como agente de diagnóstico e tratamento, se torna muito interessante, ainda mais quando a partícula apresenta um potencial de funcionalização para aumentar sua especificidade.

#### **6.3.4 Distribuição de partículas por análise de microCT: potencial diagnóstico de NPMs**

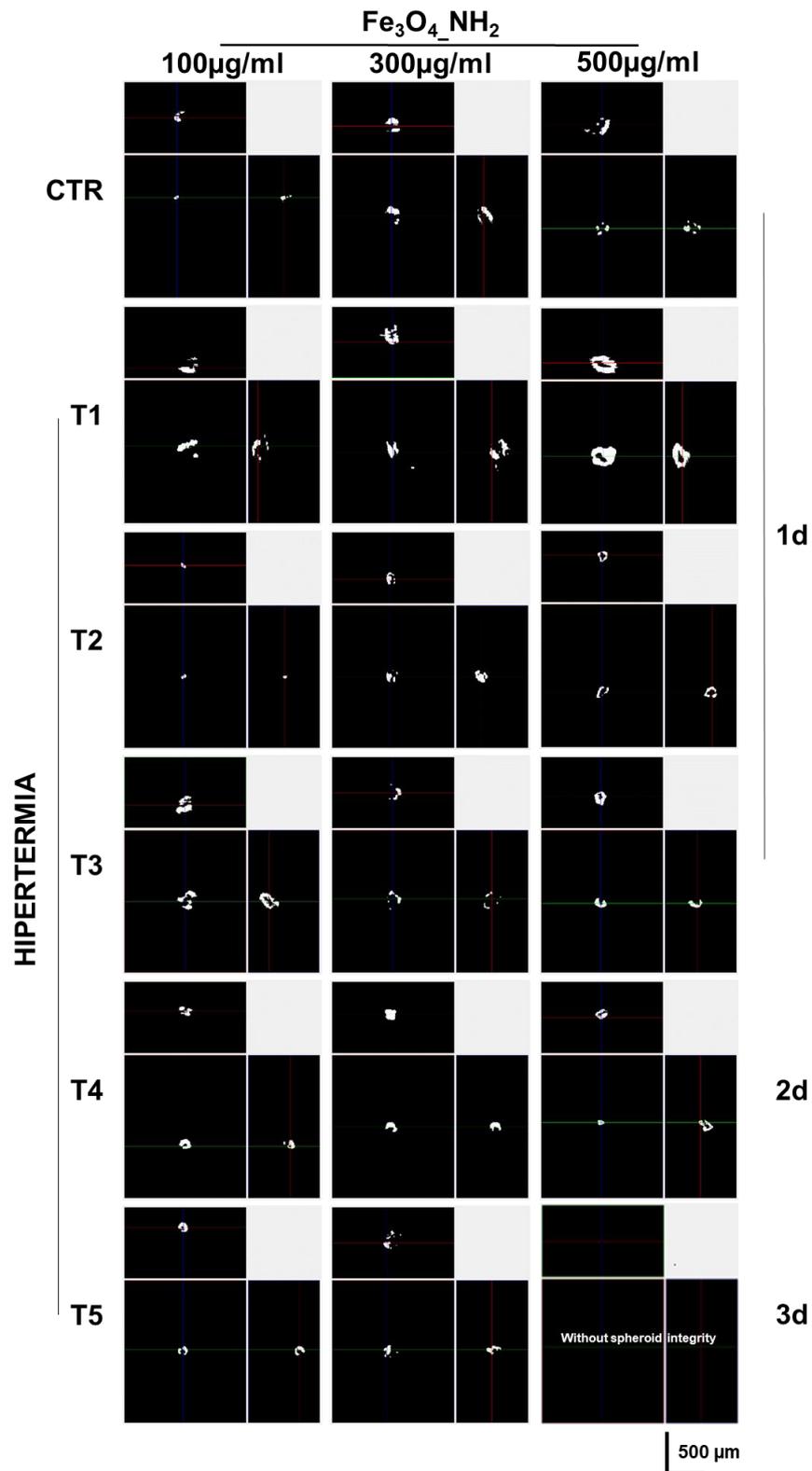
A técnica de microscopia confocal não permite a visualização das NPMs e sua distribuição dentro do esferoide, a não ser intermediada por marcadores fluorescentes de superfície. Em contrapartida, o óxido de ferro é um material que, devido a suas propriedades de magnetismo, cristalinidade e elevada densidade eletrônica, é um bom agente de contraste para análises por tomografia. Assim, os esferoides expostos às NPMs em diferentes concentrações foram submetidos a medidas por microCT, permitindo uma análise de distribuição de partículas em microescala. Cortes centrais (em XY, XZ e YZ)

das imagens geradas por microCT (Figura 60) mostram claramente a distribuição de grandes aglomerados de NPMs dentro dos esferoides, em todas as concentrações de exposição. Essa análise preliminar indica uma dispersão das NPMs na primeira aplicação de campo magnético alternado (T1), seguida por uma redução dessa dispersão a partir da segunda aplicação de campo (T2 a T5). Essa redução de área ocupada pelas NPMs pode estar associada à concentração das NPMs em regiões específicas do esferoide, associada a uma internalização efetiva, ou perda de estruturas celulares, associada a mortes celulares e desprendimento da estrutura central do esferoide.

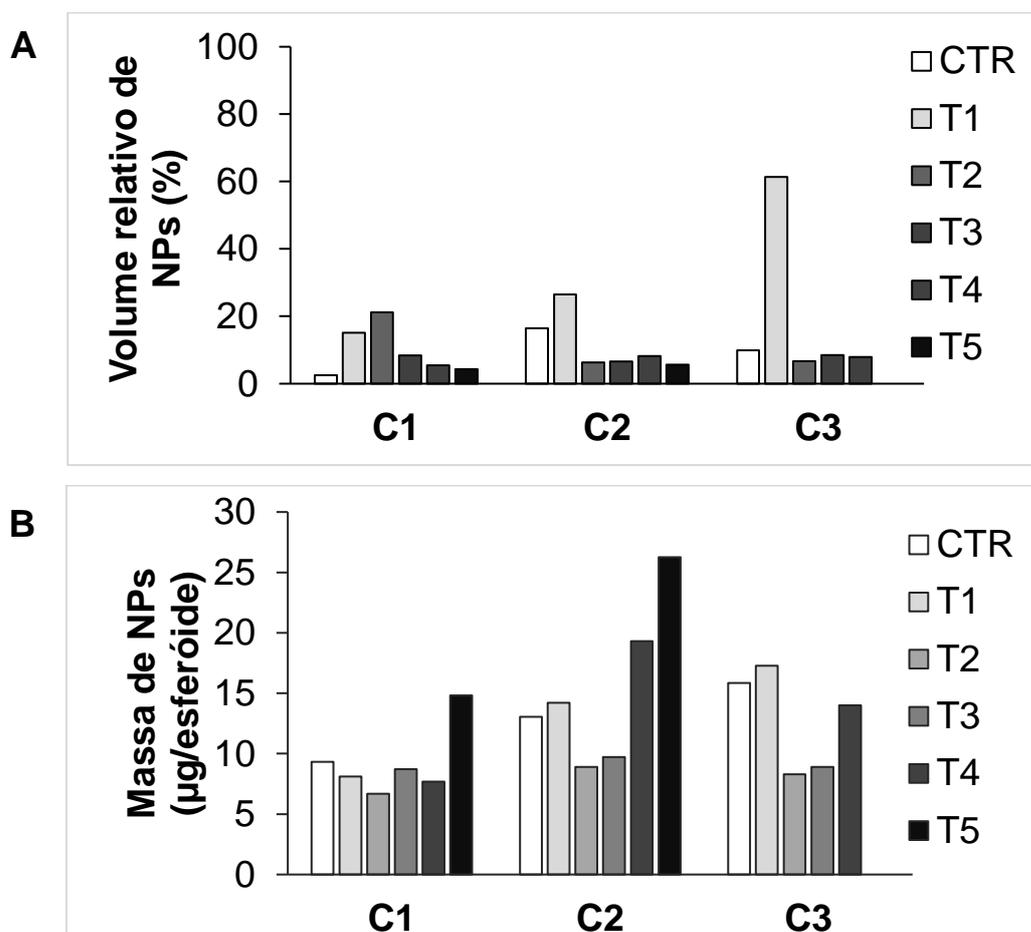
Para avaliar de forma mais aprofundada, estas imagens foram processadas matematicamente, sendo medido o volume ocupado pelos aglomerados de NPMs detectados por microCT (volume em branco em relação ao volume inicial teórico de um esferoide de 600  $\mu\text{m}$ ), antes e após aplicação dos ciclos de campo magnético (Figura 61-A). Complementarmente, foram realizadas quantificações químicas da massa de NPMs contidas nos esferoides em todos os casos estudados (Figura 61-B).

O volume ocupado nas amostras controle (sem aplicação de campo) aumentou, passando da concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  para de 300  $\mu\text{g/mL}$ , e diminuiu na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . Contudo, após análise da massa das partículas magnéticas presentes em cada amostra, os resultados mostraram um aumento da massa de NPMs dependente da concentração nas condições não sujeitas à aplicação de campo. Estes resultados confirmam que a microtomografia agrega uma informação de dispersão de NPMs. Confrontando ambas as medidas, pode ser atestado que a maior concentração de NPMs induz a formação de aglomerados, mesmo que em massa a resposta à internalização seja dependente da dose.

**Figura 60.** Distribuição de NPMs (em branco) em esferoides a partir de imagens de microCT representativas do corte central dos esferoides (em XY, XZ e YZ).



**Figura 61.** Volume relativo ocupado pelas NPMs (A) e quantificação de NPMs (B) internalizadas pelos esferoides antes e depois da aplicação do campo magnético alternado.



Nota 1: CTR = controle (ausência de campo magnético) – [NPM] = 100 µg/mL, C2 – [NPM] = 300 µg/mL, C3 – [NPM] = 500 µg/mL.

Nota 2: massa de NPM por poço: C1 – mNPM = 20 µg, C2 – mNPM = 60 µg, C3 – mNPM = 100 µg.

Nota 3: a ausência da barra correspondente à condição C3xT5 se deve ao esferóide ter se desintegrado nessa condição, não permitindo uma quantificação neste caso.

A aplicação do primeiro ciclo de campo (T1) levou ao aumento do volume ocupado pelas nanopartículas no interior do esferóide, provavelmente devido ao efeito do campo magnético no espalhamento das partículas. Este resultado foi confirmado pelos resultados da quantificação da massa de NPMs que mostrou, após a exposição ao primeiro ciclo de campo, que a concentração de nanopartículas não variou significativamente com relação ao controle. Portanto, a aplicação de campo magnético não parece afetar a internalização inicialmente, mas parece afetar a distribuição das nanopartículas no esferóide. Sendo assim, o campo magnético alternado não gera um efeito apenas de indução de liberação de calor, mas também um efeito de movimentação das NPMs.

Na segunda aplicação de campo (T2), este efeito de espalhamento das NPMs só foi observado na menor concentração de nanopartículas (C1 - caso em que a quantidade de massa de NPM internalizada também se mantém constante frente ao controle). Nas condições de concentração de NPM intermediária e superior (C2 e C3), o volume ocupado pelas nanopartículas se reduziu consideravelmente, estando acoplado a uma redução de massa de nanopartículas (frente ao controle). Este comportamento reforça a observação da redução de tamanho dos esferoides mediada pelas imagens de epifluorescência (Figura 59), confirmando que esta redução de tamanho está associada à morte celular e desprendimento de células das camadas mais externas do esferoide. Isto justifica a não variação na condição C1 para a aplicação T2 e sugere que o efeito do campo magnético foi mais pronunciado nos casos de maior internalização de NPMs, como esperado.

Na terceira aplicação de campo (T3), a redução de volume ocupado pelas NPMs foi observada para a menor concentração (C1); no entanto, a massa de nanopartículas se manteve constante. Este comportamento de redução de volume foi mantido para o caso de menor concentração de NPMs nas demais aplicações de campo (T4 e T5). Portanto, o contato do esferoide com nanopartículas em baixas concentrações não induziu morte celular considerável. Neste caso, de exposição a baixas concentrações de NPMs, foi observada uma dinâmica de expansão e contração do volume ocupado por uma massa constante de NPMs internalizada. Em contrapartida, na quinta aplicação de campo foi observado um incremento de massa magnética internalizado. Este comportamento, que foge ao padrão apresentado para baixas concentrações de exposição, sugere uma sensibilização do esferoide a uma sequência de exposição a campos magnéticos.

Assim, é possível inferir que na quinta exposição ao campo magnético as células estavam mais suscetíveis à internalização de uma nova carga de NPMs, dada à possível fragilização das células pelo movimento mecânico das NPMs no interior do esferoide. Provavelmente aplicações adicionais de campo promoveriam uma redução gradual de viabilidade celular. Pode-se sugerir que, neste caso, a morte celular esteja mais associada ao movimento físico das partículas no interior das células do que ao efeito térmico advindo da capacidade de liberação de calor das NPMs submetidas ao campo magnético alternado. Provavelmente esta condição também tenda a induzir mortes celulares primordialmente por apoptose do que necrose, dada a dinâmica mais lenta de resposta celular em condição de exposição a baixas concentrações de NPMs.

No caso das exposições a maiores concentrações de NPMs (C2 e C3), a partir da terceira aplicação de campo o volume ocupado pelas nanopartículas se manteve constante, enquanto a massa de NPMs internalizadas aumentou significativamente. Este comportamento reforça a hipótese de que a sensibilização do esferoide frente à sequência de exposição a campos magnéticos favoreceu a internalização de novas doses de nanopartículas. Vale ressaltar que ao longo das cinco exposições de campo o esferoide estava em contato constante com as NPMs expostas inicialmente; por isso, é coerente observar novas internalizações. Estas comparações só foram possíveis devido aos experimentos terem sido realizados em triplicatas e um exemplar de esferoide ter sido reservado, lavado e processado para análises individuais após cada condição exposta. Neste contexto, os esferoides não estavam sujeitos apenas ao efeito da dinâmica (de movimento e aquecimento) das NPMs internalizadas, mas também ao efeito do contato externo com as NPMs remanescentes em meio de cultura. De qualquer forma, acredita-se que os efeitos observados possam ser prioritariamente atribuídos à dinâmica das NPMs internalizadas.

Em linhas gerais, a variação de concentrações de NPMs a que os esferoides foram expostos, somada às aplicações sucessivas de campo magnético alternado, permitiram inferir uma dinâmica dupla de efeito das nanopartículas à indução de morte celular: (i) movimento físico e (ii) efeito térmico. Estas observações podem estar intimamente ligadas aos processos de relaxação das nanopartículas magnéticas (relaxação de Brown e relaxação de Néel). A relaxação de Brown está associada ao movimento Browniano, que descreve o movimento aleatório de partículas em suspensão em um meio (que também pode refletir em perdas térmicas). Já a relaxação de Néel está associada ao efeito térmico advindo da oscilação do momento magnético das partículas, em resposta à aplicação de campo magnético externo, sem que haja movimentação física das partículas. Sendo assim, podemos inferir que a relaxação de Brown apresentou efeitos mais pronunciados em condições de baixas concentrações de NPMs ou exposições mais breves a campos magnéticos alternados. Complementarmente, a relaxação de Néel apresentou efeitos mais pronunciados de forma cumulativa à aplicação de campo, bem como em relação direta ao incremento de concentração de NPM (MAMANI *et al.*, 2021).

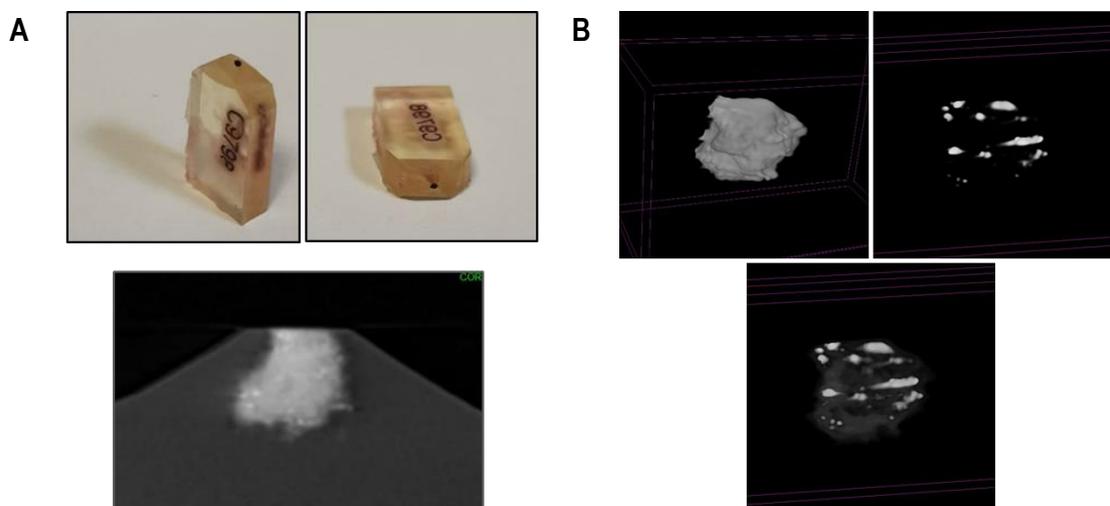
O sistema 3D apresenta tanto partículas internalizadas quanto partículas livres no espaço extracelular; portanto, os fenômenos de relaxação de Brown e Néel podem explicar as dinâmicas de espalhamento das partículas após os ciclos de aplicação de

campo magnético alternado. Estudos recentes mostram que a exposição ao campo magnético alternado pode induzir uma migração das partículas magnéticas para partes mais internas do tumor (BEOLA *et al.*, 2021).

O uso da técnica de microCT pode trazer mais uma vantagem para a validação diagnóstica, pois representa a metodologia de imagem utilizada em pacientes humanos sem a necessidade de métodos invasivos para obtenção de biópsia tumoral, o que nem sempre é possível devido à localização do tumor. Portanto, validar o modelo com esta técnica adiciona um valor translacional a este estudo. Contudo, o esferoide celular é um modelo que apresenta dimensões na ordem de grandeza da resolução da técnica de microCT, o que reflete em deficiências na qualidade da imagem gerada. Para contornar esta limitação, o esferoide exposto à condição de concentração intermediária de NPMs (apresentou perfil de internalização e resposta às aplicações de campo mais representativo), em condição controle, foi submetido a um processamento diferenciado e foi novamente analisado por microCT.

Neste caso, o esferoide foi processado seguindo o padrão de preparo de amostras para análise de microscopia eletrônica, em que as células são pós-fixadas com uma solução de tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio (Os-FeCNK), permitindo a visualização dos espaços extracelulares do esferoide, uma vez que estas substâncias se ligam às membranas lipídicas celulares, atuando como contraste e refletindo um perfil opaco. Esta preparação permitiu a visualização da estrutura do esferoide celular, não visíveis sem uso da pós-fixação com Os-FeCNK, aumentando o contraste das membranas celulares e permitindo de fato, além da visualização dos nanossistemas, o entendimento melhor da distribuição dos aglomerados de ferro em relação à estrutura 3D do esferoide (Figura 62). Desta forma, foi confirmada, de maneira inequívoca, a internalização das NPMs nos esferoides celulares, ainda permitindo a observação do perfil de distribuição dos aglomerados de nanopartículas.

**Figura 62.** Imagens de microCT de esferoides contrastados com Os-FeCNK. (A) Esferoide emblocado em resina e (B) identificação das NPMs limitadas pela estrutura do esferoide.



Nota: É possível, pelos diferentes contrastes, visualizar o formato do esferoide e distinguir dos nanossistemas, mais radiopaco que o componente celular orgânico.

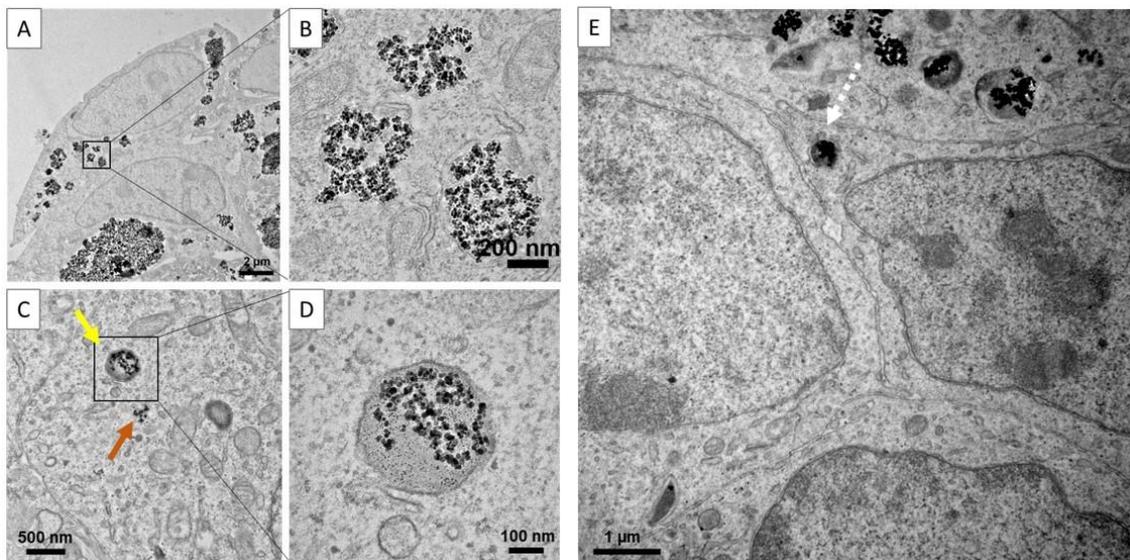
### **6.3.5 Internalização e distribuição de NPs em esferoides: análise morfológica ultraestrutural (MET)**

As análises obtidas por microCT permitiram confirmar a internalização das NPMs nos esferoides celulares; porém, não pode ser afirmada se esta internalização foi efetivamente em cada célula individualizada que compõe o esferoide, uma vez que as partículas também podem ter sido internalizadas apenas nos espaços intracelulares, ficando alocadas na interface célula-célula. Para ter certeza quanto ao modo de internalização no esferoide, é necessário fazer uma análise ultraestrutural mediada por microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Neste contexto, alguns esferoides, submetidos a diferentes concentrações de NPMs e diferentes condições de exposição a aplicações de campo magnético alternado foram avaliados por MET. A análise dos resultados obtidos com diferentes técnicas de imagem proporcionou informações complementares acerca de aspectos do fenômeno em diferentes escalas de tamanho. As micrografias de transmissão de amostras controle (Figura 63) mostram como as partículas de óxido de ferro foram internalizadas de forma massiva pelos esferoides (Figura 63-A – borda do esferoide com células contendo NPMs

– e sua magnificação em B – destacando as os aglomerados de NPMs internalizadas). Além disso, a microscopia eletrônica de transmissão forneceu informações detalhadas sobre a dinâmica da nanoestrutura em ambiente celular. Por exemplo, a internalização das NPMs pelas células ocorre mediante formação de vesículas delimitadas por membrana (Figura 63-C, seta amarela, e sua magnificação em D), mas também são observadas nanopartículas livres no citoplasma (Figura 63-C, seta laranja), indicando a possibilidade de diferentes vias envolvidas na internalização destes. Além disso, é possível observar como estas partículas conseguem transitar entre as camadas do esferoide para adentrar na sua parte mais central, passando de célula para célula (Figura 63-E, seta branca). Vale destacar que não foram observados aglomerados de NPMs nas regiões intersticiais do esferoide (espaço entre células).

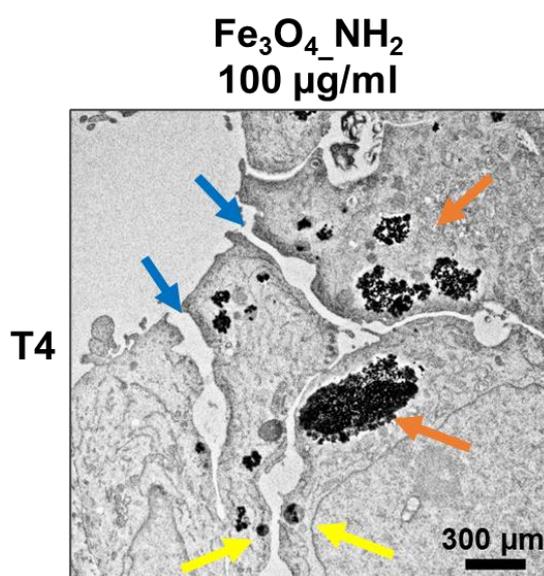
**Figura 63.** Internalização das NPMs ( $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ ) pelas células do esferoide celular (ctr, 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). As NPM são internalizadas pelo esferoide de forma maciça (A e B), localizando-se no interior da célula tanto livres no citoplasma, quanto envoltas por membrana (C, seta laranja, e D, seta amarela) e transitando entre as camadas de células (E, seta branca).



Quando foi realizada a aplicação do campo magnético, observou-se progressiva deterioração das organelas intracelulares, conforme aumentaram os ciclos de campo aplicado. Na Figura 64 pode ser observado que, após exposição das células a 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  e aplicação de 4 ciclos cumulativos de campo magnético, ocorreu maciça internalização dos nanossistemas, que se apresentavam envolvidos por vesículas (setas

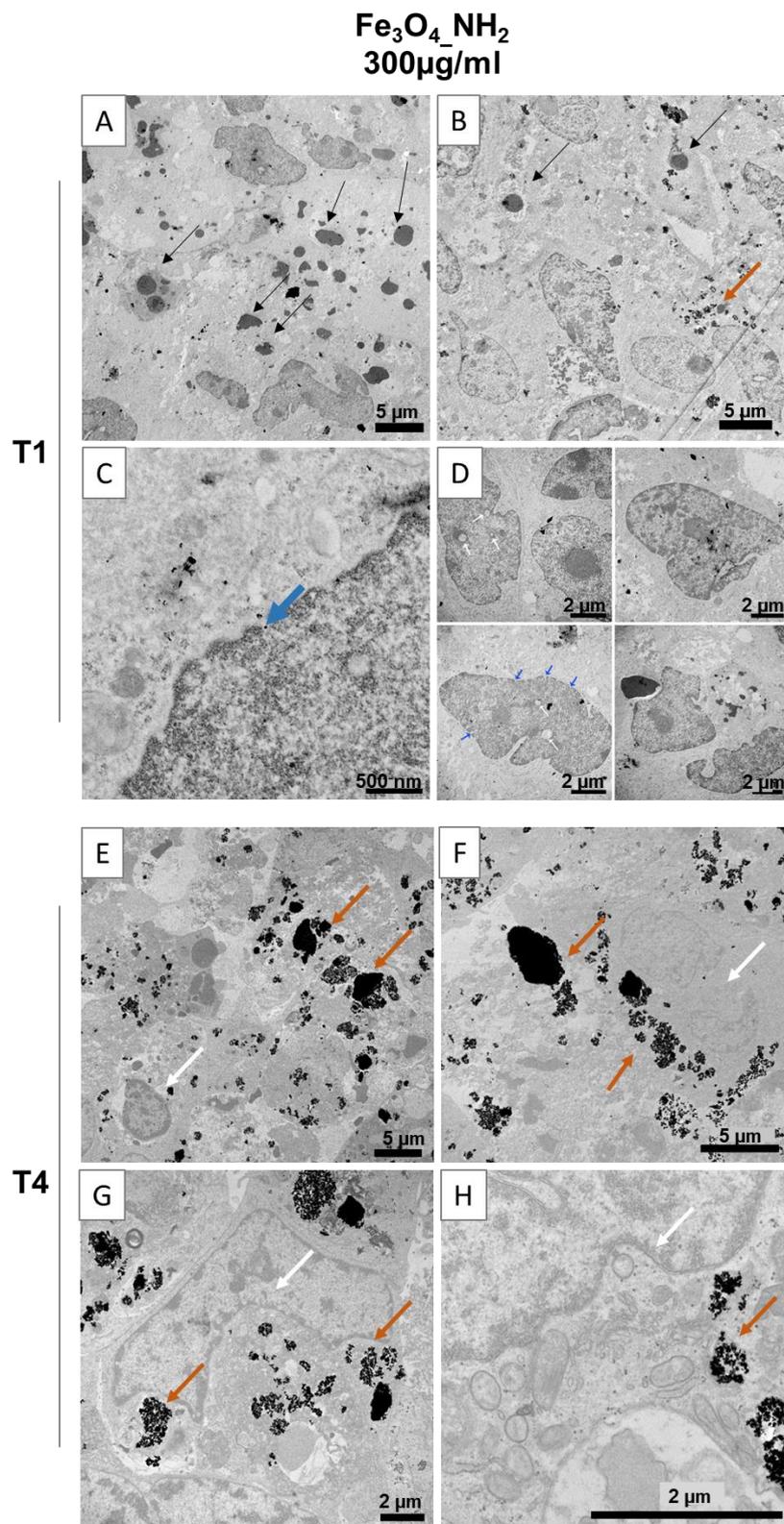
amarelas) ou livres no citoplasma (setas laranja). Estes resultados corroboram os observados pelas técnicas anteriores (Seções 6.3.3 e 6.3.4). Nesta condição, ainda pode ser observada a desorganização das junções celulares (Figura 64, indicado pelas setas azuis). A desorganização das junções celulares afeta diretamente a integridade estrutural do esferoide e facilita a internalização de novas NPMs no esferoide.

**Figura 64.** Esferoide exposto a 100 µg/mL de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$  e a 4 ciclos de campo magnético. São observadas partículas de ferro internalizadas dentro de vesículas (setas amarelas) ou livres no citoplasma (setas laranjas). O esferoide mostra perda de integridade estrutural (setas azuis).



Aumentando a concentração de partículas para 300 µg/mL (Figura 65), as células localizadas mais proximamente da borda do esferoide mostraram o comprometimento sério das organelas intracelulares, após a exposição a apenas um campo magnético (Figura 65-A). Na porção central do esferoide (Figura 65-B) foram observados grumos de partículas (seta laranja) que não se observaram na borda. Aglomerados eletrodensos (Figura 65-C, setas azuis) também foram observados nas células. Os núcleos das células apresentaram morfologia ameboide, indicando o comprometimento da estrutura, com aberturas na membrana nuclear e/ou poros (Figura 65-D, setas azuis) e vacúolos (Figura 65-D, setas brancas).

**Figura 65.** Esferoide exposto a 300  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{-NH}_2$ . Exposição a 1 (A-D) e 4 (E-H) ciclos de aplicação de campo magnético alternado.

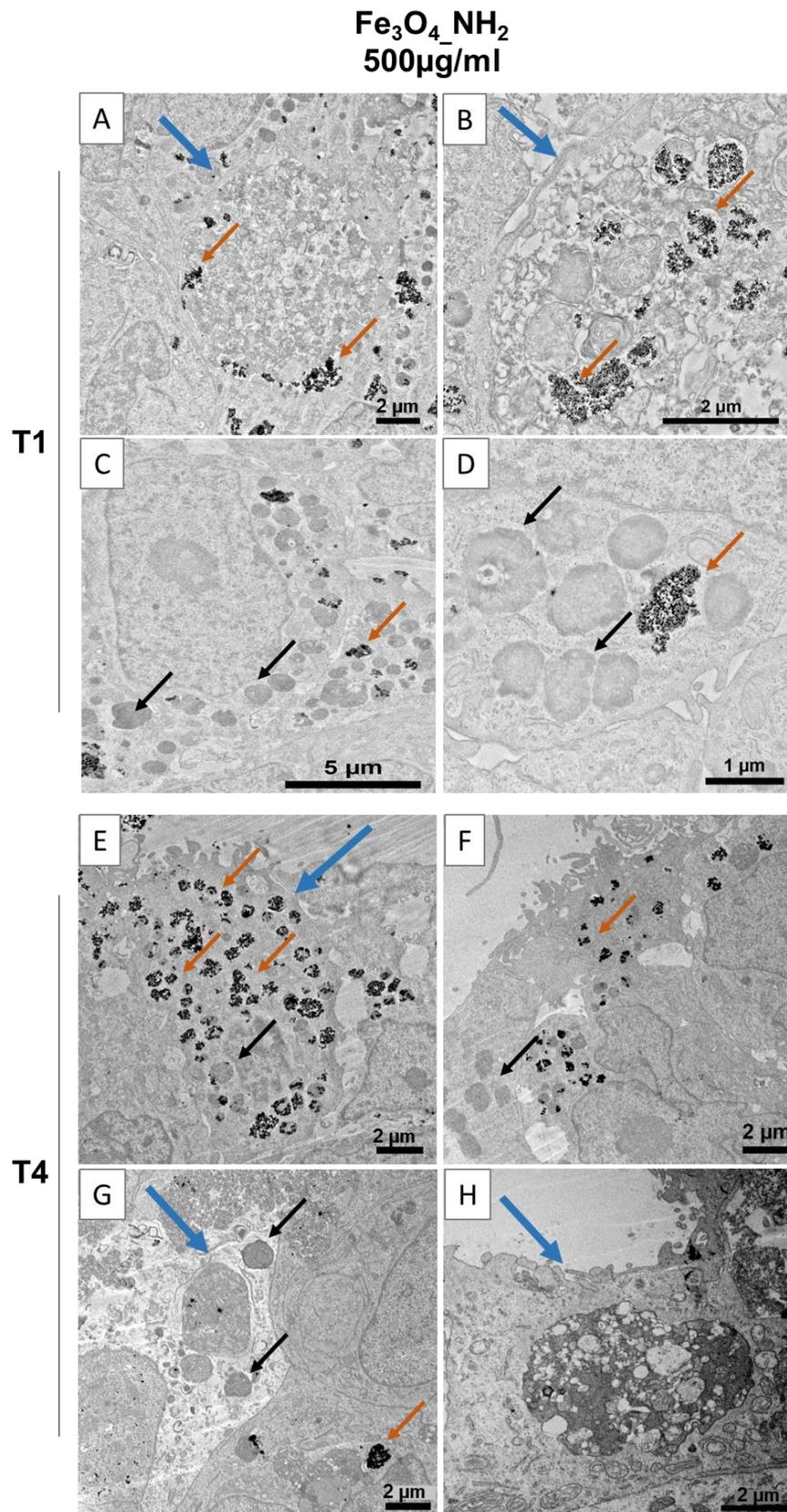


Aumentando os ciclos de campo aplicados para 4 ciclos cumulativos (Figura 65-E-H), aumenta-se o comprometimento celular. Grandes grumos de partículas puderam ser então observados no espaço entre as células (setas laranjas), sendo que apenas algumas organelas intracelulares mantiveram a própria morfologia e os núcleos mostraram estrutura ameboide e comprometimento estrutural severo (setas brancas).

Por fim, expondo as células a uma concentração de 500 µg/mL de NPMs (Figura 66), foi observada internalização celular mais localizada, com o comprometimento celular (setas laranjas) após um ciclo de campo magnético (Figura 66-A-D) e mais generalizada com a aplicação cumulativa de 4 ciclos de campo (Figura 66-E-H). Nesta concentração, as micrografias mostram células lisadas (setas azuis) no meio de células intactas (Figura 66-A e B). Além disso, são presentes, nas células que mostram internalização de nanopartículas de óxido de ferro, estruturas eletrondensas (Figura 66-C e D, setas pretas), similares com as observadas após exposição de 300 µg/mL (Figura 65). Estes tipos de estruturas estavam presentes também após a aplicação de 4 ciclos cumulativos de campo magnético, com um comprometimento celular sempre localizado, mas, neste caso, mais severo (Figura 66-E-G, setas pretas).

Os resultados de microscopia eletrônica confirmam e complementam os obtidos por microscopia de fluorescência (Figura 59, Seção 6.3.3), em que foi mostrada a diminuição do tamanho do esferoide de forma dependente da quantidade de ciclos de campo aplicado, mas com o melhor efeito de redução mostrado após a exposição da dose de 300 µg/mL. Dados na literatura mostram modelos de exposição de estruturas 3D a nanopartículas, com partículas localizadas apenas no interior da célula (modelo *In*) ou dentro e fora das células (modelo *In&Out*). Neste último modelo, BEOLA *et al.* (2018) mostraram como o tratamento de hipertermia magnética facilitou a migração dos nanossistemas das áreas externas da estrutura 3D para as partes internas, permitindo uma distribuição mais rápida para o interior do esferoide, confirmando os resultados apresentados nas análises de microCT conduzidas no presente trabalho. Esta migração poderia explicar os danos observados nas células. A concentração de 100 µg/mL (menor concentração) pode facilitar a relaxação de Brown e Néel, associados à permanência intracelular e extracelular das nanopartículas (MAMANI *et al.*, 2021) e, possivelmente, à geração de um dano celular menos localizado associado a concentrações menores.

**Figura 66.** Esferoide exposto a 500 µg/mL de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>. Exposição a 1. (A-D) e 4 (E-G) ciclos de aplicação de campo magnético.



A localização das nanopartículas causou também diferente ativação de morte celular, causando necrose no modelo In e apoptose no modelo *In&Out*, correlacionados também com a quantidade de partículas internalizadas pela célula. Dados na literatura apontam a ruptura da matriz extracelular, causada pelas partículas localizadas externamente às células (BEOLA *et al.*, 2021), corroborando a perda de integridade mostrada nos resultados obtidos, desde a aplicação de campo magnético cumulativo após exposição com 100 µg/mL de nanopartículas (Figura 64).

Supreendentemente, uma dose maior de exposição das células às partículas mostrou uma morte celular mais localizada e sem afetar as células ao redor, sugerindo a apoptose celular controlada, quando comparada a doses menores de partículas, independentemente da quantidade de ciclos de campo aplicado. Isso pode ser explicado com a distribuição de partículas observadas na análise de microCT. Provavelmente, a concentração de 500 µg/mL de Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> resultou uma tendência maior a aglomerar, reduzindo a quantidade de nanopartículas internalizadas pelas células e corroborando os resultados na literatura, que indicam que menores quantidades de nanopartículas magnéticas levam à morte por apoptose.

Estes resultados também estão consistentes com a tendência ao menor aumento de massa de partículas observado após a exposição de quatro ciclos de campo magnético na concentração de exposição de 500 µg/mL, quando comparada com a mesma situação após a exposição de 300 µg/mL. Esta diferença se deve, provavelmente, ao comprometimento localizado da integridade estrutural do esferoide que, criando fendas dentro da estrutura, cria a condição para a perda das partículas previamente internalizadas, efeito este potencializado pelo movimento de fluidos e das próprias NPMs, promovido pelas aplicações repetidas de campo magnéticos.

Os resultados mostrados no presente trabalho estão consistentes com o trabalho de BEOLA *et al.* (2020). Estes autores mostraram também diferenças morfológicas nas imagens que podem ser correlacionadas a concentrações de NPMs e quantidades de ciclos cumulativos de campo magnético aplicado, sugerindo a ativação de diferentes mecanismos de morte.

As vias de sinalização da morte celular ativadas pela hipertermia magnética dependem fortemente da quantidade de partículas usadas. Uma baixa atividade da

caspace-8 e uma alta razão BAX/BCL2<sup>7</sup> foi observada após internalização de baixas quantidades de partículas (abaixo de 1 pg/célula), sugerindo a ativação da via intrínseca de apoptose, enquanto doses maiores (7,5 pg/célula) aumentam a caspace 8 (via de apoptose extrínseca). Contudo, as duas situações facilmente coexistem nos modelos experimentais, desencadeando concomitantemente diversas vias de morte celular (FARINHA *et al.*, 2021).

Os resultados aqui obtidos mostraram que uma concentração de exposição de 300 µg/mL é possivelmente capaz de induzir a morte generalizada, sugerindo a ativação de necrose celular. Ao contrário, a dose maior de 500 µg/mL, que, como mostrado pela distribuição de partículas analisada por microCT, resultou em menor espalhamento das partículas no esferoide e, possivelmente, menor internalização delas, parece ativar a via apoptótica. Novos estudos para entender os mecanismos moleculares ativados após a acumulação dos campos magnéticos e se a ativação da morte celular é ou não ativada pela dose de partículas serão necessários e se tornam fundamentais para elucidar os eventos biológicos ativadores e a eficácia da hipertermia magnética.

#### **6.4 Conclusão**

O presente capítulo validou o uso de nanopartículas de óxido de ferro como agente teranóstico. Os nanossistemas demonstraram interação com os esferoides dependente da dose e do tempo e redução do tamanho de esferoide a partir do segundo ciclo de exposição de campo magnético, com melhor efeito na dose de 300 µg/mL. A avaliação por microCT mostrou o potencial para diagnóstico dos nanossistemas desenvolvidos, com aumento do volume ocupado das nanopartículas no interior do esferoide após a aplicação do primeiro ciclo de campo e não nos ciclos sucessivos, confirmando a possível movimentação das partículas, com um efeito que pode somar ao efeito gerado pela hipertermia. Por fim, foi mostrada a maciça internalização dos nanossistemas com dano celular progressivo, dependente do número de ciclos acumulados, mostrando morte celular difusa e generalizada após a exposição de 300 µg/mL e morte mais localizada após exposição na dose de 500 µg/mL.

---

<sup>7</sup>A função e a ação da proteína BAX são reduzidas na presença da proteína BCL2 pela formação do heterodímero BAX-BCL2, é importante analisar a razão da expressão de ambas, uma vez que se a presença de BCL2 for elevada em relação à de BAX, a formação de heterodímeros pode estar aumentada impedindo que BAX atue estimulando indução de apoptose (REED, 2002).

## 6.5 Cooperações técnicas produções científicas

### 6.5.1 Colaborações

O presente Capítulo foi desenvolvido com as seguintes colaborações:

- 1) **Alexsandro Cruz** – Pesquisador do Centro Brasileiros de Pesquisas Físicas (CBPF): validação de imageamento por RMN em modelo de fantomas.
- 2) **Gabriela Sena** – Pesquisadora da Universidade Federal do Rio de Janeiro: validação de imageamento por microCT em modelo de fantomas.
- 3) **Sara Gemini-Piperni** – Professora coordenadora do Laboratório de Biotecnologia, Bioengenharia e Biomateriais Nanoestruturados (Laben-ICB-UFRJ): realização dos ensaios em modelos celulares 3D.
- 4) **Caio Márcio Sorrentino de Freitas Farias dos Santos** – Doutorando do Laboratório de Instrumentação Nuclear, Programa de Engenharia Nuclear (PEN/COPPE/UFRJ): análises de microCT.
- 5) **Celio Lucas Valente Rodrigues** – Doutorando do Centro Brasileiros de Pesquisas Físicas (CBPF): quantificação da massa de nanopartículas internalizadas.
- 6) **Camila Hubner Costabile Wendt** – Pesquisadora do Laboratório de Biomineralização (ICB-UFRJ): análise de microscopia eletrônica de transmissão.

### 6.5.2 Orientações

Não há orientações/supervisões relacionadas a este capítulo.

### 6.5.3 Produções científicas

- 1) *Theranostic effect of magnetic iron oxide nanoparticle functionalized with aminosilane in osteosarcoma 3D cancer models*, a ser apresentado na modalidade oral no XXI B-MRS Meeting da Sociedade Brasileira de Pesquisa em Materiais (SBPMAT 2023).

# 7 CAPÍTULO VII

## Considerações Finais e Propostas para Trabalhos Futuros

És um senhor tão bonito  
Quanto a cara do meu filho  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Vou te fazer um pedido  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

Compositor de destinos  
Tambor de todos os ritmos  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Entro num acordo contigo  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

Por seres tão inventivo  
E pareceres contínuo  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
És um dos deuses mais  
lindos  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

Que sejas ainda mais vivo  
No som do meu estribilho

Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Ouve bem o que te digo  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

Peço-te o prazer legítimo  
E o movimento preciso  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Quando o tempo for propício  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

De modo que o meu espírito  
Ganhe um brilho definido  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
E eu espalhe benefícios  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

O que usaremos pra isso  
Fica guardado em sigilo  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Apenas contigo e comigo

Tempo, tempo, tempo,  
tempo

E quando eu tiver saído  
Para fora do teu círculo  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Não serei nem terás sido  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

Ainda assim acredito  
Ser possível reunirmo-nos  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Num outro nível de vínculo  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

Portanto, peço-te aquilo  
E te ofereço elogios  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo  
Nas rimas do meu estilo  
Tempo, tempo, tempo,  
tempo

Oração ao Tempo (Caetano Veloso)

## 7.1 Considerações finais

Diante os resultados apresentados e discutidos ao longo desta tese, é notório o potencial de uso das nanopartículas multifuncionais aplicadas para o teranóstico tumoral. Vale ressaltar o efeito sinérgico da interação de cada componente integrante do nanossistema desenhado para atingir o objetivo proposto. As nanopartículas magnéticas podem atuar tanto como agente de contraste (por ressonância magnética nuclear ou tomografia computadorizada) para geração de imagens diagnósticas, quanto como geradora de calor (sob aplicação de um campo magnético alternado externo) para terapia térmica (hipertermia magnética). Os fluoróforos naturais permitem a geração de imagens de curto alcance, por emissão de fluorescência, facilitando a visualização de marcação celular *ex vivo*. Tais fluoróforos também apresentam efeitos terapêuticos que podem incrementar a eficiência no tratamento oncológico. Além disso, a interação entre partícula magnética e as moléculas de fluoróforo permitem teranósticos mais avançados, como no caso da terapia fotoacústica ou terapia fotodinâmica. O encapsulamento em matriz polimérica incrementa a estabilidade coloidal do nanossistema, a biocompatibilidade do material, a proteção contra processos oxidativos (tanto da nanopartícula magnética, quanto do fluoróforo), além de facilitar futura bioconjugação de moléculas bioativas na superfície do material. Portanto, os nanossistemas desenvolvidos nesta tese não consistem em apenas uma solução para a problemática do teranóstico tumoral, mas sim uma plataforma tecnológica com infinitas possibilidades.

A curcumina natural foi apresentada como um fluoróforo promissor para aplicações biotecnológicas em saúde, apresentando propriedades de fluorescência (quando exposta a luz em baixos comprimentos de onda – violeta/verde), bem como propriedades bioativas (não exploradas nesta tese), que associadas a polímero em nanoescala podem ser potencializadas. O encapsulamento de extrato de cúrcuma em PMMA indicou o incremento de fotoestabilidade, resultando em perda lenta de coloração, quando exposto a UVA e luz branca. A adição de ácido acrílico como comonômero na matriz polimérica induziu um efeito sutil de *red shift*, suficiente para induzir fluorescência no vermelho mais pronunciada no copolímero do que no homopolímero, o que foi atribuído ao incremento de polaridade na matriz polimérica. Não foi possível afirmar de maneira inequívoca se a curcumina atua como comonômero, mas essa foi uma hipótese levantada e baseada em resultados da modelagem fenomenológica de polimerização via radicais livres.

As nanopartículas magnéticas de óxido de ferro, obtidas pelo método de coprecipitação apresentaram morfologia esférica, com diâmetro médio de  $12 \pm 2$  nm. As NPMs de óxido de ferro (SPIONs) foram funcionalizadas com grupamentos aminosilano, mantendo morfologia e tamanho. A funcionalização foi realizada com o intuito de gerar um potencial de superfície positivo em condições biológicas, visando a promover incremento de internalização celular, o que foi confirmado pelo deslocamento para a direita do potencial isoelétrico da partícula após modificação de superfície (de 5,4 para 6,7). A composição da NPM foi avaliada por DRX, sugerindo ser magnetita. No entanto, os perfis de difração da magnetita e maghemita são muito similares e a transição de fase é ditada por oxidações espontâneas. Dessa forma, as medidas de magnetização corroboram a fase prioritária de magnetita no material magnético ( $M_s$  de  $67,0 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$  a 300 K). A funcionalização não afetou significativamente a magnetização do material ( $M_s$  de  $61,0 \text{ emu}\cdot\text{g}^{-1}$  a 300 K) e foi confirmada por FTIR.

Ambas as nanopartículas (pura e funcionalizada) não apresentaram toxicidade em elevadas concentrações (até  $1,0 \text{ mg/mL}$ ), sendo expostas a células de mamífero (Balb-C e A549). Células de mamífero (mesenquimais e A549) revelaram elevada capacidade de internalização das nanopartículas funcionalizadas (NPM\_ $\text{NH}_2$ ). Além disso, foi realizada uma prova de conceito da terapia via hipertermia magnética em modelo celular 2D (A549), que indicou a redução significativa da viabilidade celular após 5 ciclos de aplicação de campo magnético alternado.

As NPMs foram encapsuladas em nanopartículas poliméricas (PMMA e P(MMA-co-AA)), junto a extrato contendo curcumina, e suas propriedades físico-químicas foram exaustivamente avaliadas, com atenção para as propriedades de magnetismo e fluorescência. O encapsulamento de aglomerados de partículas magnéticas e extrato de cúrcuma em matriz polimérica foi confirmado e os nanossistemas finais mantiveram as propriedades de magnetismo e fluorescência. Estes nanossistemas foram internalizados em células de mamífero (SAOS2), confirmando por microscopia confocal a internalização efetiva no interior da célula (permeando a membrana celular). Portanto, os nanossistemas magnético-fluorescentes obtidos abrem maiores possibilidades de exploração do campo de medicina teranóstica, possibilitando diagnóstico por ressonância magnética ou tomografia computadorizada e/ou por fluorescência e tratamento por hipertermia magnética e/ou terapia fotodinâmica.

A validação do potencial teranóstico das NPMs foi realizada em modelos celulares 3D. Preliminarmente, a sensibilidade do diagnóstico por ressonância magnética e tomografia computadorizada foi validada em modelos de fantasmas, indicando potencial de ambas as técnicas para imageamento com os nanossistemas, com vantagens na técnica de tomografia. Posteriormente, o ensaio celular foi realizado empregando a técnica de microCT, validando o diagnóstico *in vitro* em esferoides celulares (SAOS2), com sensibilidade na ordem de micrômetros. A hipertermia magnética também foi validada neste modelo, tendo sido aprimorado o protocolo para 5 ciclos de aplicação de campo magnético alternados, com variações de concentrações de NPMs. O efeito terapêutico foi confirmado por imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Imagens de MET comprovaram a internalização celular das NPMs em forma livre ou de vesículas intracelulares, com sugestão de migração das partículas entre células. O efeito cumulativo de aplicações sucessivas de campo magnético alternado, foi claramente observado por imagens de MET, em que as estruturas celulares perderam a integridade de maneira dependente da dose e do tempo.

## 7.2 Propostas para trabalhos futuros

- Avaliação das propriedades antimicrobianas e anti-inflamatórias do extrato de cúrcuma nanoencapsulado em matriz polimérica, em comparação à atividade do extrato livre;
- Avaliação da indução do efeito *red shift* da curcumina incorporada em polímeros, relacionando à polaridade da matriz polimérica, com o objetivo de potencializar marcadores fluorescentes com absorção na região do vermelho do espectro eletromagnético;
- Avaliação do favorecimento da penetração de nanoestruturas ao interior de células, quando recobertas por biomoléculas específicas, com o intuito de compreender o mecanismo de interação entre essas nanoestruturas modificadas e as células-alvo;
- Validação do nanossistema como marcador fluorescente *ex vivo* e marcador magnético *in vivo*;
- Validação de hipertermia magnética do nanossistema magnético-fluorescente-polimérico;
- Validação de diagnóstico por tomografia e tratamento por hipertermia magnética em modelos *in vivo*, com ênfase na eficácia terapêutica, segurança e biocompatibilidade do nanossistema.

### **7.3 Captação de recursos de fomento a inovação**

#### **7.3.1 Projetos como coordenador da proposta**

Em paralelo ao doutorado, estruturei a startup Magtech Soluções em Nanopartículas Magnéticas Ltda. Sendo sócio fundador de uma empresa de base tecnológica, foi possível submeter projetos para captação de recursos direcionados à inovação. Nos projetos apresentados a seguir, figuro como proponente e coordenador, tendo sido desenvolvidos em paralelo ao doutorado. Estes projetos apresentam relação direta ou indireta com a presente tese.

- 1) **Edital FAPERJ N° 06/2019** - Programa Apoio à Inserção de Pesquisadores em Empresas

Projeto: Engenharia reversa de um marcador nanoestruturado magnético-fluorescente com potencial para rastreamento de células-tronco e teranóstico tumoral

Recurso envolvido: R\$ 120.720,00

Natureza do recurso: Bolsas

Vigência: 2020

- 2) **Edital FAPERJ nº 17/2021** - Programa Apoio à Inserção de Pesquisadores em Empresas

Projeto: Desenvolvimento de um nanomarcador magnético decorado com quantum dots para rastreamento celular, por fluorescência e ressonância, e validação para o mercado de *Life Science*

Recurso envolvido: R\$ 227.550,00

Natureza do recurso: Bolsas

Vigência: 2021

- 3) **Edital ICT Catalisa SEBRAE 2022**

Projeto: Escalonamento de beads magnéticos para suporte de biomoléculas

Recurso envolvido: R\$ 147.500,00

Natureza do recurso: Bolsas e custeio

Vigência: 2022

- 4) **EDITAL FAPERJ N° 12/2022** – Programa de Apoio a Projetos Científicos e Tecnológicos em Ciências Agrárias no Estado Do Rio De Janeiro – 2022

Projeto: Mapeamento de derivas de pesticidas agrícolas empregando sensores nanoestruturados prototipados por impressão 3D e eletrofiação.

Recurso envolvido: R\$ 1.349.519,56.

Natureza do recurso: Capital e custeio

Vigência: 2023-2025

- 5) **Chamada CNPq/MCTI/FNDCT N° 22/2022** – Programa MCTI de Inovação em Grafeno, InovaGrafeno-MCTI – 2022

Projeto: Kit diagnóstico para câncer de pulmão empregando anticorpos ancorados em quantum dots de grafeno.

Recurso envolvido: R\$ 523.000,00

Natureza do recurso: Bolsas e custeio

Vigência: 2023-2025

### ***7.3.2 Projetos como apoiador/colaborador da proposta***

Apoiei outros projetos desde a elaboração até a execução, que são coordenados por parceiros científicos. Estes projetos, listados a seguir, estão intimamente relacionados as minhas linhas de pesquisa, tendo relação direta ou indireta com esta tese.

- 1) **Chamada Universal MCTIC/CNPq n.º 28/2018**

Projeto: Prospecção de um novo marcador nanoestruturado magnético-fluorescente para rastreamento de células-tronco

Proponente: Jasmin

ICT envolvida: UFRJ (NumpexBio/Xerém)

Recurso envolvido: R\$ 40.000,00

Natureza do recurso: Custeio

Vigência: 2018-2019

- 2) **CONECTA STARTUP BRASIL 039/2019** - Chamada pública para seleção de equipes empreendedoras e startups em estágio de ideação

Projeto: Organ chip – Desenvolvimento de dispositivo de microfluídica para avaliação de esferoides celulares

Proponente: Tiago Balbino

ICT envolvida: UFRJ (PENT)

Natureza do recurso: Bolsas

Vigência: 2019

- 3) **Edital FAPERJ N.º 02/2019** – Programa Redes de Pesquisa em Nanotecnologia no Estado do Rio de Janeiro

Projeto: Consolidação de rede multidisciplinar (NanoSaúde) para o desenvolvimento translacional de nanoprodutos para o diagnóstico, tratamento de tumores, traumas e doenças degenerativas.

Proponente: Alexandre Rossi

ICTs envolvidas: CBPF, UFRJ, UFF, INMETRO, INCA

Natureza do recurso: Bolsas, custeio e capital

Vigência: 2019-2024

- 4) **Chamada CNPq/MCTI/SEMPI N° 33/2020. RHAE** - Recursos Humanos em Áreas Estratégicas. Pesquisador na Empresa Incubada

Projeto: Escalonamento de produção de nanopartículas magnéticas, em ambiente operacional, visando a introdução de insumos no mercado de biotecnologia, direcionados para pesquisa científica e/ou ensaios *in vitro*.

Proponente: Helen da Rosa

Empresa vinculada: Safe Lab

Recurso envolvido: R\$ 64.800,00

Natureza do recurso: Bolsas

Vigência: 2021-2023

5) **Edital FAPERJ nº 27/2021** – Auxílio Básico à Pesquisa (APQ1) em ICTs sediadas no estado do Rio de Janeiro

Projeto: Desenvolvimento de suporte enzimático magnético nanoestruturado para aplicação biotecnológica.

Proponente: Priscilla Finotelli

ICT envolvida: UFRJ (LabNanoBiof/Faculdade de Farmácia)

Natureza do recurso: Custeio e capital

Vigência: 2021-2024

6) **Edital FAPERJ nº 27/2021** – Auxílio Básico à Pesquisa (APQ1) em ICTs sediadas no estado do Rio de Janeiro

Projeto: Nanoimunoterapia em oncologia: repolarização de macrófagos induzida pelo potencial elétrico de nanopartículas de magnetita.

Proponente: Helen Ferraz

ICT envolvida: UFRJ (LABEFIT/PEQ/COPPE)

Natureza do recurso: Custeio e capital

Vigência: 2021-2024

7) **Edital FAPERJ nº 39/2021** – Apoio ao jovem pesquisador fluminense com vínculo em ICTs do estado do RJ

Projeto: Metodologia alternativa ao uso de animais direcionada à terapêutica personalizada: Hipertermia magnética aplicada a esferoides tumorais em chips de microfluídica com macrófagos circulantes.

Proponente: Sara Gemini-Piperni

ICT envolvida: UFRJ (LaB&N /Instituto de Ciências Biomédicas)

Recurso envolvido: R\$ 375.632,00

Natureza do recurso: Bolsas, custeio e capital

Vigência: 2021-2024

8) **Edital FAPERJ nº 40/2021** – Apoio ao jovem pesquisador fluminense sem vínculo em ICTs do estado do RJ

Projeto: Aplicação da biofotônica na interação parasito-hospedeiro-microbiota: desenvolvimento de nanopartículas magnéticas/fluorescentes para rastreamento celular e molecular em tempo real, utilizando insetos como modelos alternativos no estudo da dinâmica de doenças parasitárias.

Proponente: Cecília Stahl

ICT envolvida: UFF, Fiocruz

Natureza do recurso: Bolsas, custeio e capital

Vigência: 2021-2024

9) **Edital FAPEMAT nº 18-/2022** – Biológicas

Projeto: Membrana de borracha natural associada a nanoemulsão de óleo vegetal de copaíba e sucupira para o tratamento de lesão por queimadura em modelo animal de diabetes.

Proponente: Paula Souto

ICT envolvida: UFMT

Natureza do recurso: Bolsas, custeio e capital

Vigência: 2022-2025

**10) Ementa parlamentar 219766**

Projeto: Cannabis medicinal: uma perspectiva diferente no combate à parasitos patogênicos.

Proponente: Vitor Midlej

ICT envolvida: Fiocruz

Natureza do recurso: Bolsas, custeio e capital

Vigência: 2023-2024

# REFERÊNCIAS

ABDELGHANY, S.; TEKKO, I. A.; VORA, L.; LARRAÑETA, E.; PERMANA, A. D.; DONNELLY, R. F. Nanosuspension-Based Dissolving Microneedle Arrays for Intradermal Delivery of Curcumin. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 7, p. 308, 2019. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/11/7/308>>.

AHANGARAN, F.; NAVARCHIAN, A. H.; PICCHIONI, F. Material encapsulation in poly(methyl methacrylate) shell: A review. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 136, n. 41, p. 1–21, 2019.

AMIT KOPARDE, A.; CHANDRASHEKAR DOJAD, R.; SHRIPAL MAGDUM, C. Natural Products in Drug Discovery. *In*: **Pharmacognosy - Medicinal Plants**. IntechOpen, 2019. p. 1–19.

AZIZ, S. B.; ABDULLAH, O. G.; BRZA, M. A.; AZAWY, A. K.; TAHIR, D. A. Effect of carbon nano-dots (CNDs) on structural and optical properties of PMMA polymer composite. **Results in Physics**, v. 15, n. May, p. 102776, 2019.

BALASUBRAMANIAN, S.; RAVINDRAN GIRIJA, A.; NAGAOKA, Y.; IWAI, S.; SUZUKI, M.; KIZHIKKILOT, V.; YOSHIDA, Y.; MAEKAWA, T.; DASAPPAN NAIR, S. Curcumin and 5-Fluorouracil-loaded, folate- and transferrin-decorated polymeric magnetic nanoformulation: A synergistic cancer therapeutic approach, accelerated by magnetic hyperthermia. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n. 1, p. 437–459, 2014.

BAÑOBRE-LÓPEZ, M.; TEIJEIRO, A.; RIVAS, J. Magnetic nanoparticle-based hyperthermia for cancer treatment. **Reports of Practical Oncology & Radiotherapy**, v. 18, n. 6, p. 397–400, 2013.  
Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1507136713010614>>.

BATTY, C. J.; BACHELDER, E. M.; AINSLIE, K. M. Historical Perspective of Clinical Nano and Microparticle Formulations for Delivery of Therapeutics. **Trends in Molecular Medicine**, v. 27, n. 6, p. 516–519, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2021.04.002>>.

BEAUCAGE, K. L.; POLLMANN, S. I.; SIMS, S. M.; DIXON, S. J.; HOLDSWORTH, D. W. Quantitative in vivo micro-computed tomography for assessment of age-dependent changes in murine whole-body composition. **Bone Reports**, v. 5, p. 70–80, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bonr.2016.04.002>>.

BEAUVOIS, S.; RENAUT, D.; LAZZARONI, R.; LAUDE, L. ; BREDAS, J. . Physico-chemical characterization of the effect of excimer laser irradiation on PMMA thin films. **Applied Surface Science**, v. 109–110, n. 110, p. 218–221, 1997. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0169433296007489>>.

BEDÊ, P. M.; SILVA, M. H. P. da; FIGUEIREDO, A. B.-H. da S.; FINOTELLI, P. V. Nanostructured magnetic alginate composites for biomedical applications. **Polímeros**, v. 27, n. 4, p. 267–272, 2017.  
Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-14282017000400267&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-14282017000400267&lng=en&tlng=en)>.

BEOLA, L.; ASÍN, L.; ROMA-RODRIGUES, C.; FERNÁNDEZ-AFONSO, Y.; FRATILA, R. M.; SERANTES, D.; RUTA, S.; CHANTRELL, R. W.; FERNANDES, A. R.; BAPTISTA, P. V.; DE LA FUENTE, J. M.; GRAZÚ, V.; GUTIÉRREZ, L. The Intracellular Number of Magnetic Nanoparticles Modulates the Apoptotic Death Pathway after Magnetic Hyperthermia Treatment. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 12, n. 39, p. 43474–43487, 2020.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.0c12900>>.

BEOLA, L.; GRAZÚ, V.; FERNÁNDEZ-AFONSO, Y.; FRATILA, R. M.; DE LAS HERAS, M.; DE LA FUENTE, J. M.; GUTIÉRREZ, L.; ASÍN, L. Critical Parameters to Improve Pancreatic Cancer Treatment Using Magnetic Hyperthermia: Field Conditions, Immune Response, and Particle Biodistribution. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 13, n. 11, p. 12982–12996, 2021.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsami.1c02338>>.

BEOLA, L.; GUTIÉRREZ, L.; FUENTE, J. M. De; GRAZÚ, V.; ASÍN, L. In vitro efficacy of magnetic hyperthermia in 3D cell culture in collagen gel matrix models. *Jici Iv*, p. 2018, 2018.

BEYAZ, S.; TANRISEVER, T.; KOCKAR, H. Emulsifier-free emulsion polymerization of methyl methacrylate containing hydrophilic magnetite nanoparticles. **Macromolecular Research**, v. 18, n. 12, p. 1154–1159, 2010.

BISHT, S.; FELDMANN, G.; SONI, S.; RAVI, R.; KARIKAR, C.; MAITRA, A.; MAITRA, A. Polymeric nanoparticle-encapsulated curcumin (“nanocurcumin”): a novel strategy for human cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 5, n. 1, p. 3, 2007. Disponível em: <<https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-5-3>>.

BLANCO-ANDUJAR, C.; ORTEGA, D.; SOUTHERN, P.; NESBITT, S. A.; THANH, N. T. K.; PANKHURST, Q. A. Real-time tracking of delayed-onset cellular apoptosis induced by intracellular magnetic hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 11, p. 121–136, 2016. Disponível em: <<http://www.futuremedicine.com/doi/full/10.2217/NNM.15.185>>.

BLOCH, F.; PURCELL, E. M. **The Nobel Prize in Physics 1952**. Disponível em: <<https://www.nobelprize.org/prizes/physics/1952/summary/>>. Acesso em: 10 fev. 2019.

BOERCKEL, J. D.; MASON, D. E.; MCDERMOTT, A. M.; ALSBERG, E. Microcomputed tomography: approaches and applications in bioengineering. **Stem Cell Research & Therapy**, v. 5, n. 6, p. 144, 2014. Disponível em: <<https://stemcellres.biomedcentral.com/articles/10.1186/scrt534>>.

BOSCHETTO, F.; HONMA, T.; ADACHI, T.; KANAMURA, N.; ZHU, W.; YAMAMOTO, T.; MARIN, E.; PEZZOTTI, G. Development and evaluation of osteogenic PMMA bone cement composite incorporating curcumin for bone repairing. **Materials Today Chemistry**, v. 27, p. 101307, 2023.

BOYER, C.; WHITTAKER, M. R.; BULMUS, V.; LIU, J.; DAVIS, T. P. The design and utility of polymer-stabilized iron-oxide nanoparticles for nanomedicine applications. **NPG Asia Materials**, v. 2, n. 1, p. 23–30, 2010.

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, n. 1, p. 81–103, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2015.08.006>>.

BROLLO, M. E. F.; OROZCO-HENAO, J. M.; LÓPEZ-RUIZ, R.; MURACA, D.; DIAS, C. S. B.; PIROTA, K. R.; KNOBEL, M. Magnetic hyperthermia in brick-like Ag@Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> core-shell nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 397, p. 20–27, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.08.081>>.

BROWNELL, L. **Researchers look toward nature to beat cancer**. Disponível em: <<https://phys.org/news/2019-03-nature-cancer.html>>. Acesso em: 10 mar. 2019.

BRUCE, I. J.; SEN, T. Surface Modification of Magnetic Nanoparticles with Alkoxysilanes and Their Application in Magnetic Bioseparations. **Langmuir**, v. 21, n. 15, p. 7029–7035, 2005. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la050553t>>.

**Bruker**. Disponível em: <<https://www.bruker.com/pt.html>>. Acesso em: 6 jun. 2023.

BRÜNINGK, S. C.; RIVENS, I.; BOX, C.; OELFKE, U.; TER HAAR, G. 3D tumour spheroids for the prediction of the effects of radiation and hyperthermia treatments. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1653, 2020. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-020-58569-4>>.

CAMPOS, I. M. F.; DE BARROS, I. R.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. P(MMA-co-AA) Nanoparticles Loaded with Cloiquinol and Functionalized with TAT Peptide. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 14, n. 2, p. 1–10, 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mren.201900046>>.

CAMPOS, I. M. F.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. Production and Functionalization of P(MMA-co-AA) Nanoparticles by Miniemulsion Polymerization. **Macromolecular Symposia**, v. 368, n. 1, p. 70–77, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/masy.201600029>>.

CAMPOS, I.; PAIVA, T.; FERRAZ, H.; PINTO, J. C. Effects of miniemulsion operation conditions on the immobilization of BSA onto PMMA nanoparticles. **Polímeros**, v. 29, n. 3, p. 1–10, 2019.

CANEVAROLO JR., S. V. **Ciência dos polímeros: um texto básico para tecnólogos e engenheiros**. 2006, 280 p.

CANEVAROLO, S. V. **Ciência do Polímeros**. 2. ed., 2006, 277 p.

CASTOR, C. A.; AZEVEDO, G.; SANTOS, J. G. F.; PINTO, J. C.; PIRES, L.; NELE, M.; PINTO, M.; PAIVA, T. PMMA-Based Biomedical Applications: Manufacture and Uses. In: BERHARDT, L. V. **Advances in Medicine and Biology**. 1. ed. New York: Nova Medicine & Health, 2019. p. 141.

CHENG, K. K.; CHAN, P. S.; FAN, S.; KWAN, S. M.; YEUNG, K. L.; WÁNG, Y.-X. J.; CHOW, A. H. L.; WU, E. X.; BAUM, L. Curcumin-conjugated magnetic nanoparticles for detecting amyloid plaques in Alzheimer's disease mice using magnetic resonance imaging (MRI). **Biomaterials**, v. 44, p. 155–172, 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0142961214012496>>.

CHIGNELL, C. F.; BILSKJ, P.; RESZKA, K. J.; MOTTEN, A. G.; SIK, R. H.; DAHL, T. A. SPECTRAL AND PHOTOCHEMICAL PROPERTIES OF CURCUMIN. **Photochemistry and Photobiology**, v. 59, n. 3, p. 295–302, 1994.

CHO, S.-H.; KIM, A.; SHIN, W.; HEO, M. B.; NOH, H. J.; HONG, K. S.; CHO, J.-H.; LIM, Y. T. Photothermal-modulated drug delivery and magnetic relaxation based on collagen/poly( $\gamma$ -glutamic acid) hydrogel. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 2607–2620, 2017. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/photothermal-modulated-drug-delivery-and-magnetic-relaxation-based-on-peer-reviewed-article-IJN>>.

CIERNIAK, R. **X-Ray Computed Tomography in Biomedical Engineering**. London: Springer London, 2011.

CLARK, D. P.; BADEA, C. T. Micro-CT of rodents: State-of-the-art and future perspectives. **Physica Medica**, v. 30, n. 6, p. 619–634, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmp.2014.05.011>>.

COSTA, L. P.; OECHSLER, B. F.; BRANDÃO, A. L. T.; GALVÃO, L. A.; PINTO, J. C. Copolymerization of Styrene and Cardanol from Cashew Nut Shell Liquid. Part I – Kinetic Modeling of Bulk Copolymerizations. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 13, n. 3, p. 1800065, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/mren.201800065>>.

DA ROCHA, L. V. M.; MERAT, L. C.; DE MENEZES, L. R.; FINOTELLI, P. V.; DA SILVA, P. S. R. C.; TAVARES, M. I. B. Extract of curcuminoids loaded on polycaprolactone and pluronic nanoparticles: chemical and structural properties. **Applied Nanoscience** 2019 10:4, v. 10, n. 4, p. 1141–1156, 2019. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13204-019-01197-w>>.

DABROWSKA, S.; DEL FATTORE, A.; KARNAS, E.; BANIEWICZ, M. F.; KOZLOWSKA, H.; MURACA, M.; JANOWSKI, M.; LUKOMSKA, B. Imaging of extracellular vesicles derived from human bone marrow mesenchymal stem cells using fluorescent and magnetic labels. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 1653–1664, 2018.

DAMASCO, J. A.; RAVI, S.; PEREZ, J. D.; HAGAMAN, D. E.; MELANCON, M. P. Understanding Nanoparticle Toxicity to Direct a Safe-by-Design Approach in Cancer Nanomedicine. **Nanomaterials**, v. 10, n. 11, p. 2186, 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-4991/10/11/2186>>.

DE CROZALS, G.; BONNET, R.; FARRE, C.; CHAIX, C. Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide. **Nano Today**, v. 11, n. 4, p. 435–463, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nantod.2016.07.002>>.

DE FRANÇA, B. M.; OLIVEIRA, S. S. C.; SOUZA, L. O. P.; MELLO, T. P.; SANTOS, A. L. S.; BELLO FORERO, J. S. Synthesis and photophysical properties of metal complexes of curcumin dyes: Solvatochromism, acidochromism, and photoactivity. **Dyes and Pigments**, v. 198, p. 110011, 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0143720821008779>>.

DEL PRADO-AUDELO, M.; CABALLERO-FLORÁN, I.; MEZA-TOLEDO, J.; MENDOZA-MUÑOZ, N.; GONZÁLEZ-TORRES, M.; FLORÁN, B.; CORTÉS, H.;

LEYVA-GÓMEZ, G. Formulations of Curcumin Nanoparticles for Brain Diseases. **Biomolecules**, v. 9, n. 2, p. 56, 2019. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2218-273X/9/2/56>>.

DHIVYA, R.; RANJANI, J.; BOWEN, P. K.; RAJENDHRAN, J.; MAYANDI, J.; ANNARAJ, J. Biocompatible curcumin loaded PMMA-PEG/ZnO nanocomposite induce apoptosis and cytotoxicity in human gastric cancer cells. **Materials Science and Engineering C**, v. 80, p. 59–68, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.128>>.

DHIVYA, R.; RANJANI, J.; RAJENDHRAN, J.; MAYANDI, J.; ANNARAJ, J. Enhancing the anti-gastric cancer activity of curcumin with biocompatible and pH sensitive PMMA-AA/ZnO nanoparticles. **Materials Science and Engineering C**, v. 82, p. 182–189, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.058>>.

DIAS, C. S. B. **Estudo de vórtice magnético em nanopartículas para aplicações em hipertermia magnética**. Universidade Estadual de Campinas, 2014.

DOBROVOLSKAIA, M. A.; PATRI, A. K.; ZHENG, J.; CLOGSTON, J. D.; AYUB, N.; AGGARWAL, P.; NEUN, B. W.; HALL, J. B.; MCNEIL, S. E. Interaction of colloidal gold nanoparticles with human blood: effects on particle size and analysis of plasma protein binding profiles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 5, n. 2, p. 106–117, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2008.08.001>>.

DONSÌ, F.; WANG, Y.; LI, J.; HUANG, Q. Preparation of Curcumin Sub-micrometer Dispersions by High-Pressure Homogenization. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 5, p. 2848–2853, mar. 2010.

ELBIALY, N. S.; ABOUSHOUSAH, S. F.; ALSHAMMARI, W. W. Long-term biodistribution and toxicity of curcumin capped iron oxide nanoparticles after single-dose administration in mice. **Life Sciences**, v. 230, n. May, p. 76–83, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.lfs.2019.05.048>>.

EMILIO, P.; BUBNIAK, S.; CLAUDIA, M.; VIEGAS, C.; CASTILHO, A.; RICCI-JUNIOR, E.; NELE, M.; CLAUDIO, A.; SAYER, C.; HENRIQUE, P.; ARAÚJO, H. De. Encapsulation of magnetic nanoparticles in poly ( methyl methacrylate ) by miniemulsion and evaluation of hyperthermia in U87MG cells. **EUROPEAN POLYMER JOURNAL**, v. 68, p. 355–365, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.04.029>>.

ESTELRICH, J.; ESCRIBANO, E.; QUERALT, J.; BUSQUETS, M. Iron Oxide Nanoparticles for Magnetically-Guided and Magnetically-Responsive Drug Delivery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 8070–8101, 2015. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/16/4/8070>>.

FARINHA, P.; COELHO, J. M. P.; REIS, C. P.; GASPAR, M. M. A Comprehensive Updated Review on Magnetic Nanoparticles in Diagnostics. **Nanomaterials**, v. 11, n. 12, p. 3432, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2079-4991/11/12/3432>>.

FELENJI, H.; JOHARI, B.; MORADI, M.; GHARBAVI, M.; DANAFAR, H. Folic Acid-Conjugated Iron Oxide Magnetic Nanoparticles Based on Bovine Serum Albumin (BSA) for Targeted Delivery of Curcumin to Suppress Liver Cancer Cells. **Chemistry**

**Africa**, v. 5, n. 5, p. 1627–1639, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s42250-022-00425-1>>.

FILHO, A. C. G. **Estudo da estrutura e propriedades magnéticas e elétricas de ferritas de Ni<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup> dopadas com Nd<sup>3+</sup>**. Universidade Federal da Paraíba, 2014.

FLANDERS, M.; GRAMLICH, W. M. Water-Soluble and Degradation-Resistant Curcumin Copolymers from Reversible Addition–Fragmentation Chain (RAFT) Copolymerization. **Macromolecules**, v. 55, n. 10, p. 4064–4075, 2022. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.macromol.2c00123>>.

FLORES-ROJAS, G. G.; LÓPEZ-SAUCEDO, F.; VERA-GRAZIANO, R.; MENDIZABAL, E.; BUCIO, E. Magnetic Nanoparticles for Medical Applications: Updated Review. **Macromol**, v. 2, n. 3, p. 374–390, 2022.

GABR, S. A.; ELSAED, W. M.; ELADL, M. A.; EL-SHERBINY, M.; EBRAHIM, H. A.; ASSERI, S. M.; ELTAHIR, Y. A. M.; ELSHERBINY, N.; ELDESOQUI, M. Curcumin Modulates Oxidative Stress, Fibrosis, and Apoptosis in Drug-Resistant Cancer Cell Lines. **Life**, v. 12, n. 9, p. 1427, 2022.

GAŁKA, P.; KOWALONEK, J.; KACZMAREK, H. Thermogravimetric analysis of thermal stability of poly(methyl methacrylate) films modified with photoinitiators. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 115, n. 2, p. 1387–1394, 2014.

GARLAND, M.; YIM, J. J.; BOGYO, M. A Bright Future for Precision Medicine: Advances in Fluorescent Chemical Probe Design and Their Clinical Application. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 1, p. 122–136, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2015.12.003>>.

GAUMET, M.; VARGAS, A.; GURNY, R.; DELIE, F. Nanoparticles for drug delivery: The need for precision in reporting particle size parameters. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 1–9, 2008. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0939641107002895>>.

GELARDI, E. L. M.; CAPRIOGLIO, D.; COLOMBO, G.; DEL GROSSO, E.; MAZZOLETTI, D.; MATTOTEIA, D.; SALAMONE, S.; FERRARIS, D. M.; ARONICA, E.; NATO, G.; BUFFO, A.; RIZZI, M.; MAGRASSI, L.; MINASSI, A.; GARAVAGLIA, S. Curcumin-based-fluorescent probes targeting ALDH1A3 as a promising tool for glioblastoma precision surgery and early diagnosis. **Communications Biology**, v. 5, n. 1, p. 1–14, 2022.

GHASEMI, F.; SHAFIEE, M.; BANIKAZEMI, Z.; POURHANIFEH, M. H.; KHANBABAEI, H.; SHAMSHIRIAN, A.; AMIRI MOGHADAM, S.; AREFNEZHAD, R.; SAHEBKAR, A.; AVAN, A.; MIRZAEI, H. Curcumin inhibits NF-κB and Wnt/β-catenin pathways in cervical cancer cells. **Pathology Research and Practice**, v. 215, n. 10, p. 1–6, 2019.

GOLOVIN, Y. I.; KLYACHKO, N. L.; MAJOUGA, A. G.; GRIBANOVSKII, S. L.; GOLOVIN, D. Y.; ZHIGACHEV, A. O.; SHUKLINOV, A. V.; EFREMOVA, M. V.; VESELOV, M. M.; VLASOVA, K. Y.; USVALIEV, A. D.; LE-DEYGEN, I. M.; KABANOV, A. V. New Approaches to Nanotheranostics: Polyfunctional Magnetic Nanoparticles Activated by Non-Heating Low-Frequency Magnetic Field Control Biochemical System with Molecular Locality and Selectivity. **Nanotechnologies in**

Russia, v. 13, n. 5–6, p. 215–239, 2018.

GONG, C. Y.; WU, Q. J.; WANG, Y. J.; ZHANG, D. D.; LUO, F.; ZHAO, X.; WEI, Y. Q.; QIAN, Z. Y. A biodegradable hydrogel system containing curcumin encapsulated in micelles for cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 34, n. 27, p. 6377–6387, 2013.

GOYA, G. F.; ASÍN, L.; IBARRA, M. R. Cell death induced by AC magnetic fields and magnetic nanoparticles: Current state and perspectives. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 810–818, 2013. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/02656736.2013.838646>>.

GUPTA, R.; SHARMA, D. Evolution of Magnetic Hyperthermia for Glioblastoma Multiforme Therapy. **ACS Chemical Neuroscience**, v. 10, n. 3, p. 1157–1172, 2019. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acscemneuro.8b00652>>.

HA, P. T.; LE, T. T. H.; BUI, T. Q.; PHAM, H. N.; HO, A. S.; NGUYEN, L. T. Doxorubicin release by magnetic inductive heating and in vivo hyperthermia-chemotherapy combined cancer treatment of multifunctional magnetic nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, v. 43, n. 14, p. 5404–5413, 2019. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C9NJ00111E>>.

HERGT, R.; DUTZ, S. Magnetic particle hyperthermia—biophysical limitations of a visionary tumour therapy. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 311, n. 1, p. 187–192, 2007. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885306025406>>.

HERVAULT, A.; THANH, N. T. K. Magnetic nanoparticle-based therapeutic agents for thermo-chemotherapy treatment of cancer. **Nanoscale**, v. 6, n. 20, p. 11553–11573, 2014. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C4NR03482A>>.

HO, D.; SUN, X.; SUN, S. Monodisperse Magnetic Nanoparticles for Theranostic Applications. **Accounts of Chemical Research**, v. 44, n. 10, p. 875–882, 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/ar200090c>>.

HONG, R. Y.; FENG, B.; CAI, X.; LIU, G.; LI, H. Z.; DING, J.; ZHENG, Y.; WEI, D. G. Double-mini-emulsion preparation of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/poly(methyl methacrylate) magnetic latex. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 112, n. 1, p. 89–98, 2009.

HÜHN, D.; KANTNER, K.; GEIDEL, C.; BRANDHOLT, S.; DE COCK, I.; SOENEN, S. J. H.; RIVERA\_GIL, P.; MONTENEGRO, J.-M.; BRAECKMANS, K.; MÜLLEN, K.; NIENHAUS, G. U.; KLAPPER, M.; PARAK, W. J. Polymer-Coated Nanoparticles Interacting with Proteins and Cells: Focusing on the Sign of the Net Charge. **ACS Nano**, v. 7, n. 4, p. 3253–3263, 2013. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn3059295>>.

HUSSAIN, Z.; THU, H. E.; AMJAD, M. W.; HUSSAIN, F.; AHMED, T. A.; KHAN, S. Exploring recent developments to improve antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial efficacy of curcumin: A review of new trends and future perspectives. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1316–1326, 2017.

INCA. **Estimativa 2023 : incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer**. 2023, 160 p.

International Organization for Standardization. **ISO 10993-5: 2009-Biological**

**evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** 2009.

JANIB, S. M.; MOSES, A. S.; MACKAY, J. A. Imaging and drug delivery using theranostic nanoparticles. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 11, p. 1052–1063, 2010.

JASMIN, .; TORRES, A. L. M.; NUNES, H. M. P.; PASSIPIERI, J. A.; JELICKS, L. A.; GASPARETTO, E. L.; SPRAY, D. C.; CAMPOS DE CARVALHO, A. C.; MENDEZ-OTERO, R. Optimized labeling of bone marrow mesenchymal cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and in vivo visualization by magnetic resonance imaging. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p. 4, 2011. Disponível em: <<http://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1477-3155-9-4>>.

JASMIN, J.; SOUZA, G. T.; ANDRADE LOUZADA, R.; ROSADO-DE-CASTRO, P. H.; MENDEZ-OTERO, R.; CARVALHO, A. C. C. Tracking stem cells with superparamagnetic iron oxide nanoparticles: perspectives and considerations. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 779–793, 2017. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/tracking-stem-cells-with-superparamagnetic-iron-oxide-nanoparticles-peer-reviewed-article-IJN>>.

JENSEN, C.; TENG, Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 7, n. March, p. 1–15, 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fmolb.2020.00033/full>>.

JI, H.; LI, X.; ZHANG, H. Natural products and drug discovery. **EMBO reports**, v. 10, n. 3, p. 194–200, 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1359644608002651>>.

JIN, Y.; JIA, C.; HUANG, S. W.; O'DONNELL, M.; GAO, X. Multifunctional nanoparticles as coupled contrast agents. **Nature Communications**, v. 1, n. 4, p. 1–8, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/ncomms1042>>.

JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, U.; ECKELT, L.; FEUSSNER, A.; WALDÖFNER, N.; SCHOLZ, R.; DEGER, S.; WUST, P.; LOENING, S. a; JORDAN, A. Clinical hyperthermia of prostate cancer using magnetic nanoparticles: Presentation of a new interstitial technique. **International Journal of Hyperthermia**, v. 21, n. 7, p. 637–647, 2005. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02656730500158360>>.

JOHANNSEN, M.; GNEVECKOW, U.; TAYMOORIAN, K.; THIESEN, B.; WALDÖFNER, N.; SCHOLZ, R.; JUNG, K.; JORDAN, A.; WUST, P.; LOENING, S. A. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial. **International Journal of Hyperthermia**, v. 23, n. 3, p. 315–323, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02656730601175479>>.

JOHANNSEN, M.; THIESEN, B.; WUST, P.; JORDAN, A. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. **Int. J. Hyperthermia**, v. 26, n. 8, p. 790–795, 2010.

JOLIVET, J.-P.; CHANÉAC, C.; TRONC, E. Iron oxide chemistry. From molecular clusters to extended solid networks. **Chem. Commun.**, v. 4, n. 5, p. 477–483, 2004. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=B304532N>>.

JORDAN, A.; SCHOLZ, R.; MAIER-HAUFF, K.; JOHANNSEN, M.; WUST, P.; NADOBNY, J.; SCHIRRA, H.; SCHMIDT, H.; DEGER, S.; LOENING, S.; LANKSCH, W.; FELIX, R. Presentation of a new magnetic field therapy system for the treatment of human solid tumors with magnetic fluid hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 225, n. 1–2, p. 118–126, 2001. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885300012397>>.

KALLUMADIL, M.; TADA, M.; NAKAGAWA, T.; ABE, M.; SOUTHERN, P.; PANKHURST, Q. A. Suitability of commercial colloids for magnetic hyperthermia. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 321, n. 10, p. 1509–1513, 2009.

KAMLET, M. J.; TAFT, R. W. The Solvatochromic Comparison Method I. The B-Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities. **Journal of the American Chemical Society**, v. 98, n. 2, p. 377–383, 1976.

KHALID, K.; TAN, X.; MOHD ZAID, H. F.; TAO, Y.; LYE CHEW, C.; CHU, D. T.; LAM, M. K.; HO, Y. C.; LIM, J. W.; CHIN WEI, L. Advanced in developmental organic and inorganic nanomaterial: a review. **Bioengineered**, v. 11, n. 1, p. 328–355, 2020.

KHARAT, M.; DU, Z.; ZHANG, G.; MCCLEMENTS, D. J. Physical and Chemical Stability of Curcumin in Aqueous Solutions and Emulsions: Impact of pH, Temperature, and Molecular Environment. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 8, p. 1525–1532, 2017.

Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jafc.6b04815>>.

KIM, H.; KWAK, G.; KIM, K.; YOON, H. Y.; KWON, I. C. Theranostic designs of biomaterials for precision medicine in cancer therapy. **Biomaterials**, v. 213, n. April, p. 119207, 2019.

KOLHATKAR, A.; JAMISON, A.; LITVINOV, D.; WILLSON, R.; LEE, T. Tuning the Magnetic Properties of Nanoparticles. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 8, p. 15977–16009, 2013. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/14/8/15977>>.

KRAMME, R.; HOFFMANN, K.-P.; POZOS, R. S. **Springer Handbook of Medical Technology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2011.

KUMAR, C. S. S. R.; MOHAMMAD, F. Magnetic nanomaterials for hyperthermia-based therapy and controlled drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 63, n. 9, p. 789–808, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2011.03.008>>.

KUSHWAHA, A. K.; GUPTA, N.; CHATTOPADHYAYA, M. C. Dynamics of adsorption of Ni(II), Co(II) and Cu(II) from aqueous solution onto newly synthesized poly[N-(4-[4-(aminophenyl)methylphenylmethacrylamide])]. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, p. S1645–S1653, 2017.

LACHOWICZ, D.; SZPAK, A.; MALEK-ZIETEK, K. E.; KEPCZYNSKI, M.; MULLER, R. N.; LAURENT, S.; NOWAKOWSKA, M.; ZAPOTOCZNY, S. Biocompatible and fluorescent superparamagnetic iron oxide nanoparticles with superior magnetic properties coated with charged polysaccharide derivatives. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 150, p. 402–407, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.11.003>>.

LAN, F.; LIU, K.-X.; JIANG, W.; ZENG, X.-B.; WU, Y.; GU, Z.-W. Facile synthesis of monodisperse superparamagnetic Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PMMA composite nanospheres with high magnetization. **Nanotechnology**, v. 22, n. 22, p. 225604, 2011.

LANDFESTER, K. Miniemulsion Polymerization and the Structure of Polymer and Hybrid Nanoparticles. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 48, n. 25, p. 4488–4507, 2009.

Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200900723>>.

LANDFESTER, K.; MUSYANOVYCH, A.; MAILANDER, V. From polymeric particles to multifunctional nanocapsules for biomedical applications using the miniemulsion process. **Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 493–515, 2010. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/pola.23786>>.

LAUTERBUR, P. C. Image Formation by Induced Local Interactions: Examples Employing Nuclear Magnetic Resonance. **Nature**, v. 242, n. 5394, p. 190–191, 1973. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/242190a0>>.

LI, H.; ZHANG, H.; TANG, Z.; HU, G. Micro-computed tomography for small animal imaging: Technological details. **Progress in Natural Science**, v. 18, n. 5, p. 513–521, 2008.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1002007108000658>>.

LI, J.; ARNAL, B.; WEI, C.-W.; SHANG, J.; NGUYEN, T.-M.; O'DONNELL, M.; GAO, X. Magneto-Optical Nanoparticles for Cyclic Magnetomotive Photoacoustic Imaging. **ACS Nano**, v. 9, n. 2, p. 1964–1976, 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn5069258>>.

LI, S.; MU, B.; YAN, P.; KANG, Y.; WANG, Q.; WANG, A. Incorporation of Different Metal Ion for Tuning Color and Enhancing Antioxidant Activity of Curcumin/Palygorskite Hybrid Materials. **Frontiers in Chemistry**, v. 9, p. 1038, 2021. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fchem.2021.760941/full>>.

LI, Z.; TAN, S.; LI, S.; SHEN, Q.; WANG, K. Cancer drug delivery in the nano era: An overview and perspectives. **Oncology Reports**, v. 38, n. 2, p. 611–624, 2017. Disponível em: <<https://www.spandidos-publications.com/10.3892/or.2017.5718>>.

LIU, H.; ZHOU, C.; LIU, X.; XU, Y.; GENG, S.; CHEN, Y.; WEI, C.; YU, C. PMMA@SCNC composite microspheres prepared from pickering emulsion template as curcumin delivery carriers. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 135, n. 15, p. 46127, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.46127>>.

LIU, X. L.; FAN, H. M. Innovative magnetic nanoparticle platform for magnetic resonance imaging and magnetic fluid hyperthermia applications. **Current Opinion in Chemical Engineering**, v. 4, p. 38–46, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coche.2013.12.010>>.

LIU, X.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; ZHU, W.; LI, G.; MA, X.; ZHANG, Y.; CHEN, S.; TIWARI, S.; SHI, K.; ZHANG, S.; FAN, H. M.; ZHAO, Y. X.; LIANG, X.-J. Comprehensive understanding of magnetic hyperthermia for improving antitumor therapeutic efficacy. **Theranostics**, v. 10, n. 8, p. 3793–3815, 2020. Disponível em: <<http://www.thno.org/v10p3793.htm>>.

LU, A.-H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic Nanoparticles: Synthesis, Protection, Functionalization, and Application. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/anie.200602866>>.

**MagForce AG Publishes Financial Results for the Year 2019 and Operative Highlights**. Disponível em: <<https://www.eqs-news.com/news/corporate/magforce-ag-publishes-financial-results-for-the-year-2019-and-operative-highlights-news-with-additional-features/1360181>>.

MAIER-HAUFF, K.; ROTHE, R.; SCHOLZ, R.; GNEVECKOW, U.; WUST, P.; THIESEN, B.; FEUSSNER, A.; DEIMLING, A.; WALDOEFNER, N.; FELIX, R.; JORDAN, A. Intracranial thermotherapy using magnetic nanoparticles combined with external beam radiotherapy: Results of a feasibility study on patients with glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 81, n. 1, p. 53–60, 2007.

MAIER-HAUFF, K.; ULRICH, F.; NESTLER, D.; NIEHOFF, H.; WUST, P.; THIESEN, B.; ORAWA, H.; BUDACH, V.; JORDAN, A. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 103, n. 2, p. 317–324, 2011. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s11060-010-0389-0>>.

MAIORANO, G.; SABELLA, S.; SORCE, B.; BRUNETTI, V.; MALVINDI, M. A.; CINGOLANI, R.; POMPA, P. P. Effects of Cell Culture Media on the Dynamic Formation of Protein–Nanoparticle Complexes and Influence on the Cellular Response. **ACS Nano**, v. 4, n. 12, p. 7481–7491, 2010. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/nn101557e>>.

MALHOTRA, N.; LEE, J. S.; LIMAN, R. A. D.; RUALLO, J. M. S.; VILLAFLORE, O. B.; GER, T. R.; HSIAO, C. Der. Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: A review. **Molecules**, v. 25, n. 14, p. 1–26, 2020.

MAMANI, J. B.; SOUZA, T. K. F.; NUCCI, M. P.; OLIVEIRA, F. A.; NUCCI, L. P.; ALVES, A. H.; REGO, G. N. A.; MARTI, L.; GAMARRA, L. F. In Vitro Evaluation of Hyperthermia Magnetic Technique Indicating the Best Strategy for Internalization of Magnetic Nanoparticles Applied in Glioblastoma Tumor Cells. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1219, 2021. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/1999-4923/13/8/1219>>.

MANGIA, L. H. R.; FERRAZ, H. C.; SOUZA, R. S. D.; PEREIRA, M. C. S.; PINTO, J. C. In situ encapsulation of rivastigmine in TAT-functionalized P(MMA-co-AA) nanoparticles through miniemulsion polymerization. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 624, p. 126776, 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0927775721006452>>.

MARTINS, M. G.; PAIVA, T. F.; GOULART, J. S.; ABREU, C. R. A.; FINOTELLI, P. V.; FERRAZ, H. C.; PINTO, J. C. Development of a fluorescent PMMA-based polymer material through in-situ incorporation of curcuma extract. **Polymer**, v. 273, p. 125870, 2023.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0032386123002008>>.

MATERÓN, E. M.; MIYAZAKI, C. M.; CARR, O.; JOSHI, N.; PICCIANI, P. H. S.; DALMASCHIO, C. J.; DAVIS, F.; SHIMIZU, F. M. Magnetic nanoparticles in

biomedical applications: A review. **Applied Surface Science Advances**, v. 6, 2021.

MBEH, D. A.; MIRELES, L. K.; STANICKI, D.; TABET, L.; MAGHNI, K.; LAURENT, S.; SACHER, E.; YAHIA, L. Human Alveolar Epithelial Cell Responses to Core–Shell Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs). **Langmuir**, v. 31, n. 13, p. 3829–3839, 2015. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/la5040646>>.

MCROBBIE, D. W.; MOORE, E. A.; GRAVES, M. J.; PRINCE, M. J. **MRI from Picture to Proton**. Cambridge: Cambridge University Press, 2007. 402 p.

MEDFORD, J. A.; HUBBARD, J. W.; ORANGE, F.; GUINEL, M. J. F.; CALCAGNO, B. O.; RINALDI, C. Magnetothermal repair of a PMMA/iron oxide magnetic nanocomposite. **Colloid and Polymer Science**, v. 292, n. 6, p. 1429–1437, 2014.

MENDES, L. P.; LIMA, E. M.; TORCHILIN, V. P. Targeted Nanotheranostics for Selective Drug Delivery in Cancer. *In*: **Handbook of Nanomaterials for Cancer Theranostics**. Elsevier, 2018. p. 245–277.

MENG, C.; ZHIKUN, W.; QIANG, L.; CHUNLING, L.; SHUANGQING, S.; SONGQING, H. Preparation of amino-functionalized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@mSiO<sub>2</sub> core-shell magnetic nanoparticles and their application for aqueous Fe<sup>3+</sup> removal. **Journal of Hazardous Materials**, v. 341, p. 198–206, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.07.062>>.

MÉRIAN, J.; GRAVIER, J.; NAVARRO, F.; TEXIER, I. Fluorescent Nanoprobes Dedicated to in Vivo Imaging: From Preclinical Validations to Clinical Translation. **Molecules**, v. 17, n. 5, p. 5564–5591, 2012. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/17/5/5564>>.

MINHACO, V. M. T. R.; MAQUERA HUACHO, P. M.; MANCINI IMBRIANI, M. J.; TONON, C. C.; CHORILLI, M.; RASTELLI, A. N. de S.; SPOLIDORIO, D. M. P. Improving antimicrobial activity against endodontic biofilm after exposure to blue light-activated novel curcumin nanoparticle. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 42, p. 103322, 2023. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1572100023000509>>.

MISHRA, A.; DASWAL, S. Curcumin, a novel natural photoinitiator for the copolymerization of styrene and methylmethacrylate. **Journal of Macromolecular Science - Pure and Applied Chemistry**, v. 42, n. 12, p. 1667–1678, 2005.

MISHRA, D.; ARORA, R.; LAHIRI, S.; AMRITPHALE, S. S.; CHANDRA, N. Synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by solvothermal method. **Protection of Metals and Physical Chemistry of Surfaces**, v. 50, n. 5, p. 628–631, 2014.

MOGHARBEL, B. F.; FRANCISCO, J. C.; IRIODA, A. C.; DZIEDZIC, D. S. M.; ELIAS FERREIRA, P.; SOUZA, D. de; SOUZA, C. M. C. O. de; BERGONSE NETO, N.; GUARITA-SOUZA, L. C.; FRANCO, C. R. C.; NAKAMURA, C. V.; KAPLUM, V.; MAZZARINO, L.; LEMOS-SENNA, E.; BORSALI, R.; SOTO, P. A.; SETTON-AVRUIJ, P.; ABDELWAHID, E.; CARVALHO, K. A. T. de. Fluorescence properties of curcumin-loaded nanoparticles for cell tracking. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 5823–5836, 2018.

Disponível em: <<https://www.dovepress.com/fluorescence-properties-of-curcumin->

loaded-nanoparticles-for-cell-trac-peer-reviewed-article-IJN>.

MOHAPATRA, J.; NIGAM, S.; GUPTA, J.; MITRA, A.; ASLAM, M.; BAHADUR, D. Enhancement of magnetic heating efficiency in size controlled MFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub> (M = Mn, Fe, Co and Ni) nanoassemblies. **RSC Advances**, v. 5, n. 19, p. 14311–14321, 2015. Disponível em: <<https://www.scopus.com/inward/record.uri?eid=2-s2.0-84922672414&partnerID=40&md5=181fb9905171566e797bb81b2bf780da>>.

MOHAPATRA, S.; MALLICK, S. K.; MAITI, T. K.; GHOSH, S. K.; PRAMANIK, P. Synthesis of highly stable folic acid conjugated magnetite nanoparticles for targeting cancer cells. **Nanotechnology**, v. 18, n. 38, p. 385102, 2007. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/0957-4484/18/38/385102>>.

MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV–visible and steady-state fluorescence spectral study. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 158, p. 212–218, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2016.03.004>>.

MUNIZ, F. T. L.; MIRANDA, M. A. R.; MORILLA DOS SANTOS, C.; SASAKI, J. M. The Scherrer equation and the dynamical theory of X-ray diffraction. **Acta Crystallographica Section A Foundations and Advances**, v. 72, n. 3, p. 385–390, 2016. Disponível em: <<https://scripts.iucr.org/cgi-bin/paper?S205327331600365X>>.

MURPHY, K. J.; BRUNBERG, J. A.; COHAN, R. H. Adverse reactions to gadolinium contrast media: a review of 36 cases. **American Journal of Roentgenology**, v. 167, n. 4, p. 847–849, 1996. Disponível em: <<https://www.ajronline.org/doi/10.2214/ajr.167.4.8819369>>.

NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. **Computed Tomography (CT)**. Disponível em: <<https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/computed-tomography-ct>>. Acesso em: 6 jun. 2023.

NGUYEN, H. N.; HA, P. T.; NGUYEN, A. S.; NGUYEN, D. T.; DO, H. D.; THI, Q. N.; NHUNG, M.; THI, H. Curcumin as fluorescent probe for directly monitoring in vitro uptake of curcumin combined paclitaxel loaded PLA-TPGS nanoparticles. **Advances in Natural Sciences: Nanoscience and Nanotechnology**, v. 7, p. 1–6, 2016.

NGUYEN, V. H.; LEE, B.-J. Protein corona: a new approach for nanomedicine design. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 12, p. 3137–3151, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.2147/IJN.S129300>>.

NGWULUKA, N. Application of In Situ Polymerization for Design and Development of Oral Drug Delivery Systems. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 4, p. 1603–1611, 2010. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1208/s12249-010-9535-4>>.

NIRMALA, M. J.; KIZHUVETIL, U.; JOHNSON, A.; G, B.; NAGARAJAN, R.; MUTHUVIJAYAN, V. Cancer nanomedicine: a review of nano-therapeutics and challenges ahead. **RSC Advances**, v. 13, n. 13, p. 8606–8629, 2023. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=D2RA07863E>>.

ODIAN, G. **Principles of Polymerization**. New Jersey, USA: John Wiley & Sons, 2004.

OLESON, J. R.; HEUSINKVELD, R. S.; MANNING, M. R. Hyperthermia by magnetic induction: II. Clinical experience with concentric electrodes. **International Journal of**

**Radiation Oncology, Biology, Physics**, v. 9, n. 4, p. 549–556, 1983.

PAIVA, T. F.; ALVES, J. B.; MELO, P. A.; PINTO, J. C. Development of Smart Polymer Microparticles through Suspension Polymerization for Treatment of Schistosomiasis. **Macromolecular Reaction Engineering**, v. 13, n. 6, p. 1–14, 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/mren.201900028>>.

PAN, W.; ZHANG, H.; CHEN, Y. Electrical and mechanical properties of PMMA/nano-ATO composites. **Journal of Materials Science and Technology**, v. 25, n. 2, p. 247–250, 2009.

PARK, J.; YANG, J.; LEE, J.; LIM, E. K.; SUH, J. S.; HUH, Y. M.; HAAM, S. Synthesis and characterization of fluorescent magneto polymeric nanoparticles (FMPNs) for bimodal imaging probes. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 340, n. 2, p. 176–181, 2009.

PAWSAT, G. A.; FRY, M. M.; SCHNEIDER, L.; SCHAEFER, D. M. W. Comparison of iron staining and scoring methods on canine bone marrow aspirates. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 50, n. 1, p. 132–141, 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/vcp.12947>>.

PERECIN, C. J.; TIRICH, B. M.; NAGAMINE, L. C. C. M.; PORTO, G.; ROCHA, F. V.; CERIZE, N. N. P.; VARANDA, L. C. Aqueous synthesis of magnetite nanoparticles for magnetic hyperthermia: Formation mechanism approach, high water-dispersity and stability. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 627, 2021.

PÉRIGO, E. A.; HEMERY, G.; SANDRE, O.; ORTEGA, D.; GARAIÓ, E.; PLAZAOLA, F.; TERAN, F. J. Fundamentals and advances in magnetic hyperthermia. **Applied Physics Reviews**, v. 2, n. 4, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1063/1.4935688>>.

PHUNG, D. C.; NGUYEN, H. T.; PHUONG TRAN, T. T.; JIN, S. G.; YONG, C. S.; TRUONG, D. H.; TRAN, T. H.; KIM, J. O. Combined hyperthermia and chemotherapy as a synergistic anticancer treatment. **Journal of Pharmaceutical Investigation**, v. 49, n. 5, p. 519–526, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s40005-019-00431-5>>.

PINTO, M. C. C.; SANTOS, J. G. F.; MACHADO, F.; PINTO, J. C. Suspension Polymerization Processes. In: **Encyclopedia of Polymer Science and Technology**. Wiley, 2013. p. 1–31.

PONGRAC, I. M.; RADMILOVIĆ, M. D.; AHMED, L. B.; MLINARIĆ, H.; REGUL, J.; ŠKOKIĆ, S.; BABIČ, M.; HORÁK, D.; HOEHN, M.; GAJOVIĆ, S. D-mannose-Coating of Maghemite Nanoparticles Improved Labeling of Neural Stem Cells and Allowed Their Visualization by ex vivo MRI after Transplantation in the Mouse Brain. **Cell Transplantation**, v. 28, n. 5, p. 553–567, 2019. Disponível em: <<http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0963689719834304>>.

PONTES-QUERO, G. M.; BENITO-GARZÓN, L.; PÉREZ CANO, J.; AGUILAR, M. R.; VÁZQUEZ-LASA, B. Amphiphilic polymeric nanoparticles encapsulating curcumin: Antioxidant, anti-inflammatory and biocompatibility studies. **Materials Science and Engineering: C**, v. 121, p. 111793, 2021.

Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111793>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

PRABHA, G.; RAJ, V. Preparation and characterization of polymer nanocomposites coated magnetic nanoparticles for drug delivery applications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 408, p. 26–34, 2016.

PRIYADARSINI, K. I. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091–20112, 2014.

QIU, G.; WANG, Q.; WANG, C.; LAU, W.; GUO, Y. Polystyrene/Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic emulsion and nanocomposite prepared by ultrasonically initiated miniemulsion polymerization. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 14, n. 1, p. 55–61, 2007.

RADIOLOGYCAFE. **CT equipment**.

Disponível em: <<https://www.radiologycafe.com/frcr-physics-notes/ct-imaging/ct-equipment/>>. Acesso em: 6 jun. 2023.

RAHN, H.; WOODWARD, R.; HOUSE, M.; ENGINEER, D.; FEINDEL, K.; DUTZ, S.; ODENBACH, S.; STPIERRE, T. Calibration standard of body tissue with magnetic nanocomposites for MRI and X-ray imaging. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 405, p. 78–87, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.12.030>>.

RAY, W. H. On the Mathematical Modeling of Polymerization Reactors. **Journal of Macromolecular Science , Part C**, v. C8, n. 1, p. 1–56, 1972.

REED, J. C. Apoptosis-based therapies. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 1, n. 2, p. 111–121, 2002.

RINCK, P. A. **MAGNETIC RESONANCE IN MEDICINE - A Critical Introduction**. Germany: BoD, 2019. 432 p.

RODRÍGUEZ, F.; CARUANA, P.; DE LA FUENTE, N.; ESPAÑOL, P.; GÁMEZ, M.; BALART, J.; LLURBA, E.; ROVIRA, R.; RUIZ, R.; MARTÍN-LORENTE, C.; CORCHERO, J. L.; CÉSPEDES, M. V. Nano-Based Approved Pharmaceuticals for Cancer Treatment: Present and Future Challenges. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 784, 2022. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2218-273X/12/6/784>>.

ROGERS, W. J.; MEYER, C. H.; KRAMER, C. M. Technology Insight: in vivo cell tracking by use of MRI. **Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine**, v. 3, n. 10, p. 554–562, 2006. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/ncpcardio0659>>.

RUAN, Y.; XIONG, Y.; FANG, W.; YU, Q.; MAI, Y.; CAO, Z.; WANG, K.; LEI, M.; XU, J.; LIU, Y.; ZHANG, X.; LIAO, W.; LIU, J. Highly sensitive Curcumin-conjugated nanotheranostic platform for detecting amyloid-beta plaques by magnetic resonance imaging and reversing cognitive deficits of Alzheimer's disease via NLRP3-inhibition. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 20, n. 1, p. 1–21, 2022.

SAHU, A.; KASOJU, N.; BORA, U. Fluorescence study of the curcumin-casein micelle complexation and its application as a drug nanocarrier to cancer cells. **Biomacromolecules**, v. 9, n. 10, p. 2905–2912, 2008.

SAIN, S.; RAY, D.; MUKHOPADHYAY, A.; SENGUPTA, S.; KAR, T.; ENNIS, C. J.; RAHMAN, P. K. S. M. Synthesis and characterization of PMMA-cellulose

nanocomposites by in situ polymerization technique. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 126, n. S1, p. E127–E134, 2012.

SAMEI, E.; PELC, N. J. **Computed Tomography**. Cham: Springer International Publishing, 2020. 367–393 p.

SANTOS, E. C. da S.; WATANABE, A.; VARGAS, M. D.; TANAKA, M. N.; GARCIA, F.; RONCONI, C. M. AMF-responsive doxorubicin loaded  $\beta$ -cyclodextrin-decorated superparamagnetic nanoparticles. **New Journal of Chemistry**, v. 42, n. 1, p. 671–680, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C7NJ02860A>>.

SANTOS, E. C. S.; CUNHA, J. A.; MARTINS, M. G.; GALEANO-VILLAR, B. M.; CARABALLO-VIVAS, R. J.; LEITE, P. B.; ROSSI, A. L.; GARCIA, F.; FINOTELLI, P. V.; FERRAZ, H. C. Curcuminoids-conjugated multicore magnetic nanoparticles: Design and characterization of a potential theranostic nanoplatform. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 879, p. 160448, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.160448>>.

SAVVA, I.; ODYSSEOS, A. D.; EVAGGELOU, L.; MARINICA, O.; VASILE, E.; VEKAS, L.; SARIGIANNIS, Y.; KRASIA-CHRISTOFOROU, T. Fabrication, characterization, and evaluation in drug release properties of magnetoactive poly(ethylene oxide)-poly(L-lactide) electrospun membranes. **Biomacromolecules**, v. 14, n. 12, p. 4436–4446, 2013.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais I: Fundamentos de Estatística e Estimação de Parâmetros**. 2007, 461 p.

SCHWAAB, M.; PINTO, J. C. **Análise de Dados Experimentais II: Planejamento de Experimentos**. 2011, 513 p.

SHANTI, R.; HADI, A. N.; SALIM, Y. S.; CHEE, S. Y.; RAMESH, S.; RAMESH, K. Degradation of ultra-high molecular weight poly(methyl methacrylate-co-butyl acrylate-co-acrylic acid) under ultra violet irradiation. **RSC Advances**, v. 7, n. 1, p. 112–120, 2017. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C6RA25313J>>.

SHEN, H.; CHEN, W.; LI, J.; LI, X.; YANG, H. Biofunctional magnetic nanoparticles as a general agent to immobilize proteins contained in traditional Chinese medicines. **Microchimica Acta**, v. 157, n. 1–2, p. 49–54, 2007. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00604-006-0648-0>>.

SHI, D.; SADAT, M. E.; DUNN, A. W.; MAST, D. B. Photo-fluorescent and magnetic properties of iron oxide nanoparticles for biomedical applications. **Nanoscale**, v. 7, n. 18, p. 8209–8232, 2015. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C5NR01538C>>.

SHIRSATH, S. R.; SABLE, S. S.; GAIKWAD, S. G.; SONAWANE, S. H.; SAINI, D. R.; GOGATE, P. R. Intensification of extraction of curcumin from *Curcuma amada* using ultrasound assisted approach: Effect of different operating parameters. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 38, p. 437–445, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1350417717301396>>.

SINDHU, K.; RAJARAM, A.; SREERAM, K. J.; RAJARAM, R. Curcumin conjugated gold nanoparticle synthesis and its biocompatibility. **RSC Advances**, v. 4, n. 4, p. 1808–1818, 2014.

SMITH, J. R.; LAMPROU, D. A. Polymer coatings for biomedical applications: A review. **Transactions of the Institute of Metal Finishing**, v. 92, n. 1, p. 9–19, 2014.

SOBH, R. A.; MOHAMED, W. S.; MOUSTAFA, A. B.; NASR, H. E. Encapsulation of Curcumin and Curcumin Derivative in Polymeric Nanospheres. **Polymer-Plastics Technology and Engineering**, v. 54, n. 14, p. 1457–1467, 2015. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/03602559.2014.1003230>>.

SOVIĆ, D.; GAJOVIĆ, A.; IVEKOVIĆ, D. Bioelectrocatalytic and biosensing properties of horseradish peroxidase covalently immobilized on (3-aminopropyl)trimethoxysilane-modified titanate nanotubes. **Electrochimica Acta**, v. 56, n. 27, p. 9953–9960, 2011.

SRIVASTAVA, N. S.; SRIVASTAVA, R. A. K. Curcumin and quercetin synergistically inhibit cancer cell proliferation in multiple cancer cells and modulate Wnt/ $\beta$ -catenin signaling and apoptotic pathways in A375 cells. **Phytomedicine**, v. 52, 2018, p. 117–128, 2019.

STOIA, M.; ISTRATIE, R.; PĂCURARIU, C. Investigation of magnetite nanoparticles stability in air by thermal analysis and FTIR spectroscopy. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 125, n. 3, p. 1185–1198, 2016. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s10973-016-5393-y>>.

SUETH-SANTIAGO, V.; MENDES-SILVA, G. P.; DECOTÉ-RICARDO, D.; LIMA, M. E. F. de. CURCUMIN, THE GOLDEN POWDER FROM TURMERIC: INSIGHTS INTO CHEMICAL AND BIOLOGICAL ACTIVITIES. **Química Nova**, v. 38, n. 4, p. 538–552, 2015. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/0100-4042.20150035>>.

TEFERA, N.; WEICKERT, G.; WESTERTERP, K. R. Modeling of free radical polymerization up to high conversion. II. Development of a mathematical model. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 63, n. 12, p. 1663–1680, 1997.

THEODOSIOU, M.; SAKELLIS, E.; BOUKOS, N.; KUSIGERSKI, V.; KALSKA-SZOSTKO, B.; EFTHIMIADOU, E. Iron oxide nanoflowers encapsulated in thermosensitive fluorescent liposomes for hyperthermia treatment of lung adenocarcinoma. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 1–15, 2022.

THOMAS, A. **Invisible Light**. Boca Raton: CRC Press, 2022. 1–23 p.

THOMFORD, N.; SENTHEBANE, D.; ROWE, A.; MUNRO, D.; SEELE, P.; MAROYI, A.; DZOBO, K. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1422-0067/19/6/1578>>.

THU HUONG, L. T.; NAM, N. H.; DOAN, D. H.; MY NHUNG, H. T.; QUANG, B. T.; NAM, P. H.; THONG, P. Q.; PHUC, N. X.; THU, H. P. Folate attached, curcumin loaded Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> nanoparticles: A novel multifunctional drug delivery system for cancer treatment. **Materials Chemistry and Physics**, v. 172, p. 98–104, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.matchemphys.2015.12.065>>.

TØNNESEN, H. H.; MÁSSON, M.; LOFTSSON, T. Studies of curcumin and curcuminoids. XXVII. Cyclodextrin complexation: Solubility, chemical and photochemical stability. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, n. 1–2, p.

127–135, 2002.

TRAN, S.; DEGIOVANNI, P.-J.; PIEL, B.; RAI, P. Cancer nanomedicine: a review of recent success in drug delivery. **Clinical and Translational Medicine**, v. 6, n. 1, p. 1–36, 2017. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1186/s40169-017-0175-0>>.

TSUDA, T. Curcumin as a functional food-derived factor: degradation products, metabolites, bioactivity, and future perspectives. **Food & Function**, v. 9, n. 2, p. 705–714, 2018. Disponível em: <<http://xlink.rsc.org/?DOI=C7FO01242J>>.

VALLABANI, N. V. S.; SINGH, S. Recent advances and future prospects of iron oxide nanoparticles in biomedicine and diagnostics. **3 Biotech**, v. 8, n. 6, p. 1–23, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s13205-018-1286-z>>.

VANGIJZEGEM, T.; LECOMTE, V.; TERNAD, I.; VAN LEUVEN, L.; MULLER, R. N.; STANICKI, D.; LAURENT, S. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION): From Fundamentals to State-of-the-Art Innovative Applications for Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 236, 2023.

VARAPRASAD, K.; YALLAPU, M. M.; NÚÑEZ, D.; OYARZÚN, P.; LÓPEZ, M.; JAYARAMUDU, T.; KARTHIKEYAN, C. Generation of engineered core-shell antibiotic nanoparticles. **RSC Advances**, v. 9, n. 15, p. 8326–8332, 2019.

VERROS, G. D.; ACHILIAS, D. S.; GIANNOUKOS, G. I. Development of a comprehensive mathematical model for free radical suspension polymerization of methyl methacrylate. **Polymer Engineering & Science**, v. 51, n. 4, p. 670–678, 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pen.21865>>.

VIEIRA, D. B.; GAMARRA, L. F. Advances in the use of nanocarriers for cancer diagnosis and treatment. **Einstein (São Paulo)**, v. 14, n. 1, p. 99–103, 2016. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1679-45082016000100099&lng=en&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082016000100099&lng=en&tlng=en)>.

VOGEL, P.; MARKERT, J.; RÜCKERT, M. A.; HERZ, S.; KESSLER, B.; DREMEL, K.; ALTHOFF, D.; WEBER, M.; BUZUG, T. M.; BLEY, T. A.; KULLMANN, W. H.; HANKE, R.; ZABLER, S.; BEHR, V. C. Magnetic Particle Imaging meets Computed Tomography: first simultaneous imaging. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 12627, 2019. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/s41598-019-48960-1>>.

VON ROEMELING, C.; JIANG, W.; CHAN, C. K.; WEISSMAN, I. L.; KIM, B. Y. S. Breaking Down the Barriers to Precision Cancer Nanomedicine. **Trends in Biotechnology**, v. 35, n. 2, p. 159–171, 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0167779916301123>>.

WARDLE, B. **Principles and Applications of Photochemistry**. 2009, 1276 p.

WEGNER, F.; VON GLADISS, A.; HAEGELE, J.; GRZYSKA, U.; SIEREN, M. M.; STAHLBERG, E.; OECHTERING, T. H.; LÜDTKE-BUZUG, K.; BARKHAUSEN, J.; BUZUG, T. M.; FRIEDRICH, T. Magnetic Particle Imaging: In vitro Signal Analysis and Lumen Quantification of 21 Endovascular Stents. **International Journal of Nanomedicine**, v. Volume 16, p. 213–221, 2021. Disponível em: <<https://www.dovepress.com/magnetic-particle-imaging-in-vitro-signal-analysis-and->

lumen-quantific-peer-reviewed-article-IJN>.

WILDEBOER, R. R.; SOUTHERN, P.; PANKHURST, Q. A. On the reliable measurement of specific absorption rates and intrinsic loss parameters in magnetic hyperthermia materials. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 47, n. 49, p. 495003, 2014.

WONG, X. Y.; SENA-TORRALBA, A.; ÁLVAREZ-DIDUK, R.; MUTHOOSAMY, K.; MERKOÇI, A. Nanomaterials for Nanotheranostics: Tuning Their Properties According to Disease Needs. **ACS Nano**, v. 14, n. 3, p. 2585–2627, 2020. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsnano.9b08133>>.

**World Health Organization**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>>. Acesso em: 10 jun. 2023.

WU, L.; WEN, W.; WANG, X.; HUANG, D.; CAO, J.; QI, X.; SHEN, S. Ultrasmall iron oxide nanoparticles cause significant toxicity by specifically inducing acute oxidative stress to multiple organs. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 19, n. 1, p. 1–14, 2022.

WU, M.; HUANG, S. Magnetic nanoparticles in cancer diagnosis, drug delivery and treatment (Review). **Molecular and Clinical Oncology**, p. 738–746, 2017. Disponível em: <<http://www.spandidos-publications.com/10.3892/mco.2017.1399>>.

WU, W.; WU, Z.; YU, T.; JIANG, C.; KIM, W.-S. Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Science and Technology of Advanced Materials**, v. 16, n. 2, p. 023501, 2015. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1088/1468-6996/16/2/023501>>.

WUST, P.; GNEVECKOW, U.; WUST, P.; GNEVECKOW, U.; JOHANNSEN, M.; BÖHMER, D.; HENKEL, T.; KAHMANN, F.; SEHOULI, J.; FELIX, R.; RICKE, J.; JORDAN, A. Magnetic nanoparticles for interstitial thermotherapy – feasibility, tolerance and achieved temperatures. **International Journal of Hyperthermia**, v. 22, n. 8, p. 673–685, 2006. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02656730601106037>>.

XU, X.; LÜ, S.; GAO, C.; FENG, C.; WU, C.; BAI, X.; GAO, N.; WANG, Z.; LIU, M. Self-fluorescent and stimuli-responsive mesoporous silica nanoparticles using a double-role curcumin gatekeeper for drug delivery. **Chemical Engineering Journal**, v. 300, p. 185–192, 2016.

YAKUB, G.; TONCHEVA, A.; MANOLOVA, N.; RASHKOV, I.; DANCHEV, D.; KUSSOVSKI, V. Electrospun polylactide-based materials for curcumin release: Photostability, antimicrobial activity, and anticoagulant effect. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 133, n. 5, p. n/a-n/a, 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/app.42940>>.

YAMAURA, M.; CAMILO, R. .; SAMPAIO, L. .; MACÊDO, M. .; NAKAMURA, M.; TOMA, H. . Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 279, n. 2–3, p. 210–217, 2004. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304885304001829>>.

YANG, H. Y.; JANG, M. S.; LI, Y.; FU, Y.; WU, T. P.; LEE, J. H.; LEE, D. S. Hierarchical tumor acidity-responsive self-assembled magnetic nanotheranostics for bimodal bioimaging and photodynamic therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 301, n. December 2018, p. 157–165, 2019.

YANG, X.; SHAO, G.; ZHANG, Y.; WANG, W.; QI, Y.; HAN, S.; LI, H. Applications of Magnetic Particle Imaging in Biomedicine: Advancements and Prospects. **Frontiers in Physiology**, v. 13, n. July, p. 1–17, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2022.898426/full>>.

ZAKARIA, H.; EL KURDI, R.; PATRA, D. Curcumin-PLGA based nanocapsule for the fluorescence spectroscopic detection of dopamine. **RSC Advances**, v. 12, n. 43, p. 28245–28253, 2022.

ZEIGHAMIAN, V.; DARABI, M.; AKBARZADEH, A.; RAHMATI-YAMCHI, M.; ZARGHAMI, N.; BADRZADEH, F.; SALEHI, R.; TABATABAEI MIRAKABAD, F. S.; TAHERI-ANGANEH, M. PNIPAAm-MAA nanoparticles as delivery vehicles for curcumin against MCF-7 breast cancer cells. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 735–742, 2016. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/21691401.2014.982803>>.

ZHANG, R. R.; SCHROEDER, A. B.; GRUDZINSKI, J. J.; ROSENTHAL, E. L.; WARRAM, J. M.; PINCHUK, A. N.; ELICEIRI, K. W.; KUO, J. S.; WEICHERT, J. P. Beyond the margins: Real-time detection of cancer using targeted fluorophores. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 14, n. 6, p. 347–364, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nrclinonc.2016.212>>.

ZHAO, S.; YU, X.; QIAN, Y.; CHEN, W.; SHEN, J. Multifunctional magnetic iron oxide nanoparticles: an advanced platform for cancer theranostics. **Theranostics**, v. 10, n. 14, p. 6278–6309, 2020. Disponível em: <<http://www.thno.org/v10p6278.htm>>.

ZSILA, F.; BIKÁDI, Z.; SIMONYI, M. Molecular basis of the Cotton effects induced by the binding of curcumin to human serum albumin. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 14, n. 16, p. 2433–2444, 2003.

Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0957416603004865>>.

# APÊNDICES

## Apêndice A – Modelagem cinética fenomenológica da polimerização do PMMA em presença de cúrcuma

A cinética de polimerização do MMA foi amplamente estudada na literatura (ACHILIAS and KIPARISSIDES, 1988). As suas principais etapas são: a iniciação, a propagação e a terminação (ODIAN, 2004).

Na etapa de iniciação há a formação de dois radicais livres ( $R$ ) oriundos da decomposição térmica, química ou fotoquímica do iniciador ( $I$ ). Em seguida, uma molécula de monômero ( $M$ ) reage com um radical livre, rompendo a ligação dupla entre os carbonos e originando um radical polimérico de tamanho unitário ( $P_1$ ), caracterizando o início da etapa de propagação. Durante essa etapa, ocorre o crescimento da cadeia polimérica por meio da adição de uma molécula de monômero a um radical de tamanho  $i$  ( $P_i$ ), adicionando assim um mero à cadeia polimérica. Em seguida, a cadeia viva com dois meros reage com mais uma molécula de monômero, formando uma molécula de polímero vivo de tamanho  $i+1$  ( $P_{i+1}$ ), para dar prosseguimento à propagação.

Na reação podem ocorrer ainda reações de transferência de cadeia, que caracterizam-se pela perda de reatividade do radical polimérico causada por outra molécula presente no meio, que pode ser o monômero, o solvente, um agente de transferência de cadeia ou até uma molécula de polímero morto. Como resultado, obtém-se em uma molécula de polímero morto ( $\Lambda_i$ ) e um radical polimérico de tamanho unitário.

Por fim, acontece a terminação. Ela pode ocorrer por desproporcionamento ou combinação. No desproporcionamento, duas moléculas de polímero vivo, de tamanho  $i$  ( $P_i$ ) e  $j$  ( $P_j$ ), interagem por meio da transferência de um átomo de hidrogênio de uma cadeia para a outra, gerando os respectivos polímeros mortos  $\Lambda_i$  e  $\Lambda_j$ . Uma das moléculas mortas, nesse caso, apresenta uma insaturação. Já na terminação por combinação, ocorre a reação entre os radicais livres dos polímeros vivos  $P_i$  e  $P_j$ , gerando uma cadeia de polímero morto de tamanho  $i+j$  ( $\Lambda_{i+j}$ ).

A Tabela 1 apresenta um resumo das etapas do mecanismo cinético descrito e suas respectivas taxas de reação. Para incluir o efeito da cúrcuma no mecanismo cinético, duas novas etapas foram adicionadas ao mecanismo cinético: (i) a cúrcuma atuando como agente de transferência de cadeia e (ii) a cúrcuma atuando como agente de terminação.

A partir do mecanismo cinético apresentado, foi possível elaborar um modelo matemático para a polimerização em massa do MMA com a cúrcuma, o qual é baseado nas equações fundamentais de balanços de massa. Para essa elaboração, algumas hipóteses foram consideradas, como apresentado a seguir:

1. Estado quasi-estacionário: essa hipótese leva em consideração que os radicais livres, por serem altamente reativos, desaparecem logo após se formarem; ou seja, não há acúmulo de radicais livres no sistema, de forma que as derivadas temporais desses constituintes são iguais zero;
2. Todas as reações são irreversíveis e elementares;
3. Cadeia Longa (LCA): a hipótese enuncia que todas as cadeias têm a mesma velocidade de reação, independentemente do tamanho. Sendo assim, as constantes das taxas de reação são consideradas independentes do tamanho da cadeia;
4. Há existência de efeito gel e vítreo.

Tabela 1: Etapas do mecanismo de polimerização do MMA

Etapa	Reação	Taxa
<b>Iniciação:</b>		
Decomposição	$I \xrightarrow{k_{id}} 2R$	$R_{id} = k_{id}I$
Iniciação de cadeia	$R + M \xrightarrow{k_{ic}} P_1$	$R_{ic} = k_{ic}RM$
<b>Propagação:</b>		
	$P_i + M \xrightarrow{k_p} P_{i+1} \quad i \geq 2$	$R_p = k_p P_i M$
<b>Transferência de cadeia:</b>		
Monômero	$P_i + M \xrightarrow{k_{tm}} P_1 + \Lambda_i$	$R_{tm} = k_{tm} P_i M$
Cúrcuma	$P_i + CU \xrightarrow{k_{tCU}} P_1 + \Lambda_i$	$R_{tCU} = k_{tCU} P_i CU$
<b>Terminação:</b>		
Combinação	$P_i + P_j \xrightarrow{k_{tc}} \Lambda_{i+j}$	$R_{tc} = k_{tc} P_i P_j$
Desproporcionamento	$P_i + P_j \xrightarrow{k_{td}} \Lambda_i + \Lambda_j$	$R_{td} = k_{td} P_i P_j$
Cúrcuma	$P_i + CU \xrightarrow{k_{cCU}} \Lambda_i$	$R_{cCU} = k_{cCU} P_i CU$

## 1. Balanços de massa

Definem-se abaixo as expressões para os balanços de massa individuais para cada componente, considerando as hipóteses citadas acima.

1. Iniciador ( $I$ ):

$$\frac{dI}{dt} = -fk_{id}[I]V \quad (1)$$

2. Radical ( $R$ ):

$$\frac{dR}{dt} = 2fk_{id}[I]V - k_{ic}[R][M]V \quad (2)$$

3. Monômero ( $M$ ):

$$\frac{dM}{dt} = -2fk_{id}[I]V - k_p[M] \sum_{i=1}^{\infty} [P_i]V + k_{tm}[M] \sum_{i=1}^{\infty} [P_i]V \quad (3)$$

4. Cúrcuma ( $CU$ ):

$$\frac{dCU}{dt} = -k_{tCU}[CU] \sum_{i=1}^{\infty} [P_i]V - k_{cCU}[CU] \sum_{i=1}^{\infty} [P_i]V \quad (4)$$

5. Cadeia polimérica ativa ( $P_i$ ):

Para  $i=1$ :

$$\begin{aligned} \frac{dP_1}{dt} = & 2fk_{id}[I]V - k_p[M][P_1]V - k_{tm}[M][P_1]V + k_{tm}[M] \sum_{i=1}^{\infty} [P_i]V \\ & - k_{tCU}[CU][P_1]V + k_{tCU}[CU] \sum_{i=1}^{\infty} [P_i]V - (k_{tc} + k_{td})[P_1] \sum_{i=1}^{\infty} [P_i]V - k_{cCU}[CU][P_1]V \end{aligned} \quad (5)$$

Para  $i>1$ :

$$\begin{aligned} \frac{dP_i}{dt} = & -k_p[M][P_i]V + k_p[M][P_{i-1}]V - k_{tm}[M][P_i]V - k_{tCU}[CU][P_i]V \\ & - k_{cCU}[CU][P_i]V - (k_{tc} + k_{td})[P_i] \sum_{j=1}^{\infty} [P_j]V \end{aligned} \quad (6)$$

6. Cadeia polimérica morta ( $\Lambda_i$ )

$$\frac{d\Lambda_i}{dt} = k_{tm}[M][P_i]V + k_{tCU}[CU][P_i]V + k_{cCU}[CU][P_i]V - \frac{k_{tc}}{2} \sum_{j=1}^{\infty} [P_j][P_{i-j}]V + k_{td}[P_i] \sum_{j=1}^{\infty} [P_j]V \quad (7)$$

Nas equações de balanço das cadeias poliméricas vivas e mortas,  $P_i$  e  $\Lambda_i$ , respectivamente, um número virtualmente infinito de equações diferenciais deve ser resolvido. No entanto, a partir da técnica dos momentos, é possível calcular propriedades como massas molares médias e índice de polidispersão, com apenas os momentos de ordem 0, 1 e 2, reduzindo assim o número de equações a serem resolvidas. Os momentos vivos e mortos são calculados de acordo com as Equações 8 e 9, respectivamente.

$$\lambda_k = \sum_{i=1}^{\infty} i^k P_i \quad (8)$$

$$\mu_k = \sum_{i=1}^{\infty} i^k \Lambda_i \quad (9)$$

Para que os momentos apareçam na equações dos balanços, é necessário multiplicar as Equações 5, 6 e 7 por  $i^k$  e depois aplicar o somatório, resultando em:

1. Momento vivo de ordem zero ( $\lambda_0$ ):

$$\frac{d\lambda_0}{dt} = 2fk_{id}[I]V - \frac{(k_{tc} + k_{td})}{V}\lambda_0^2 - k_{ccu}[CU]\lambda_0 \quad (10)$$

2. Momento vivo de ordem um ( $\lambda_1$ ):

$$\begin{aligned} \frac{d\lambda_1}{dt} = & 2fk_{id}[I]V + k_p[M]\lambda_0 + k_{tm}[M](\lambda_0 - \lambda_1) \\ & + k_{tcu}[CU](\lambda_0 - \lambda_1) - \frac{(k_{tc} + k_{td})}{V}\lambda_0\lambda_1 - k_{ccu}[CU]\lambda_1 \end{aligned} \quad (11)$$

3. Momento vivo de ordem dois ( $\lambda_2$ ):

$$\begin{aligned} \frac{d\lambda_2}{dt} = & 2fk_{id}[I]V + k_p[M](\lambda_0 + 2\lambda_1) + k_{tm}[M](\lambda_0 - \lambda_2) \\ & + k_{tcu}[CU](\lambda_0 - \lambda_2) - \frac{(k_{tc} + k_{td})}{V}\lambda_0\lambda_2 - k_{ccu}[CU]\lambda_2 \end{aligned} \quad (12)$$

4. Momento morto de ordem zero ( $\mu_0$ ):

$$\frac{d\mu_0}{dt} = k_{tm}[M]\lambda_0 + k_{tcu}[CU]\lambda_0 + \frac{(k_{tc}/2 + k_{td})}{V}\lambda_0^2 + k_{ccu}[CU]\lambda_0 \quad (13)$$

5. Momento morto de ordem um ( $\mu_1$ ):

$$\frac{d\mu_1}{dt} = k_{tm}[M]\lambda_1 + k_{tcu}[CU]\lambda_1 + \frac{(k_{tc} + k_{td})}{V}\lambda_0\lambda_1 + k_{ccu}[CU]\lambda_1 \quad (14)$$

6. Momento morto de ordem dois ( $\mu_2$ ):

$$\frac{d\mu_2}{dt} = k_{tm}[M]\lambda_2 + k_{tcu}[CU]\lambda_2 + \frac{k_{td}}{V}\lambda_0\lambda_2 + \frac{k_{tc}}{V}(\lambda_0\lambda_2 + \lambda_1^2) + k_{ccu}[CU]\lambda_2 \quad (15)$$

. polimerização do MMA é muito susceptível a efeitos difusivos, como o efeito gel e vítreo, que alteraram as constantes de terminação por combinação e propagação do modelo cinético. Para que seja possível corrigir essas alterações, é preciso modificar os termos das constantes cinéticas utilizando as expressões para  $g_t$  e  $g_p$  (PINTO and RAY, 1995):

$$g_t = \begin{cases} 0, 10575 * \exp(17, 5v_f - 0, 01715(T - 273, 15)), & \text{para } v_f > v_{ftc} \\ 2, 3 * 10^{-6} \exp(75v_f), & \text{para } v_f \leq v_{ftc} \end{cases} \quad (16)$$

$$g_p = \begin{cases} 1, & \text{para } v_f > v_{fpc} \\ 7, 1 * 10^{-5} \exp(171, 53v_f), & \text{para } v_f \leq v_{fpc} \end{cases} \quad (17)$$

em que,

$$\begin{aligned} v_{ftc} &= 0, 1856 - 2, 965 * 10^{-4}(T - 273, 15) \\ v_{fpc} &= 0, 05 \end{aligned} \quad (18)$$

O tamanho médio da cadeia por número ( $i_n$ ), o tamanho médio por peso ( $i_w$ ) e o índice de polidispersão (IPD) podem ser calculados por meio dos momentos de ordem 0, 1 e 2, como é mostrado a seguir (PINTO and RAY, 1995):

$$\begin{aligned} i_n &= \frac{\lambda_1 + \mu_1}{\lambda_0 + \mu_0}; \\ i_w &= \frac{\lambda_2 + \mu_2}{\lambda_1 + \mu_1}; \\ IPD &= i_w/i_n \end{aligned} \tag{19}$$

Logo, a massa molar numérica média ( $\bar{M}_n$ ) e a massa molar ponderada média ( $\bar{M}_w$ ) podem ser obtidas por meio das seguintes equações (PINTO and RAY, 1995):

$$\begin{aligned} \bar{M}_n &= MM_{mero} * i_n; \\ \bar{M}_w &= MM_{mero} * i_w; \end{aligned} \tag{20}$$

## 2. Parâmetros de simulação

O modelo matemático final foi implementado em MATLAB, usando a função “ode23t” para integrar o sistema de equações pela técnica de BDF (do inglês *Backwards Differentiation Formula*), com tolerância relativa e absoluta de  $10^{-8}$ . Os parâmetros cinéticos utilizados na resolução do modelo foram retirados do trabalho de TEFERA *et al.* (1997). Os valores dos parâmetros encontram-se na Tabela 2.

Tabela 2: Parâmetros cinéticos (TEFERA *et al.*, 1997).

Parâmetro	Valor	Unidade
$k_{id}$	$2.8 \times 10^{15} \exp(-15685/T)$	1/s
$k_p$	$4.9 \times 10^8 \exp(-2190/T) * gp$	$cm^3/(mol \cdot s)$
$k_{tm}$	$1.3 \times 10^{11} \exp(-9218/T)$	$cm^3/(mol \cdot s)$
$k_{tc}$	$9.8 \times 10^{10} \exp(-353/T) * gt$	$cm^3/(mol \cdot s)$
$k_{td}$	$k_{tc}$	$cm^3/(mol \cdot s)$
$f$	$-6.5 \times 10^{-4}T^2 + 0.4856T - 89.8232$	-

Experimentos com a reação de polimerização em massa do MMA sem a cúrcuma (Branco) para diferentes temperaturas foi feito, com o objetivo de avaliarmos se as constantes cinéticas retiradas da literatura representam bem os dados experimentais. Esses resultados estão apresentados na Figura 1. O grau de concordância entre as conversões obtidas pelo modelo e os dados pode ser considerado satisfatório. Verifica-se ainda que as massa molares médias obtidas pelo modelo estão coerentes com o encontrado na literatura ( $M_w \approx 4 \times 10^5$ ).

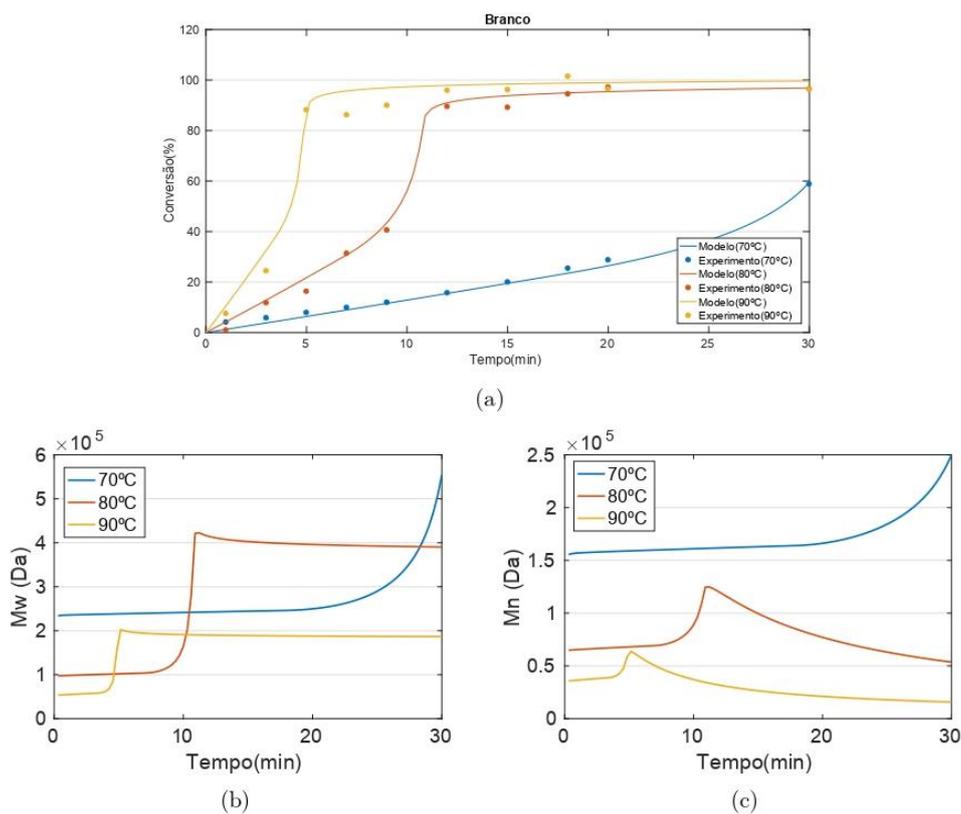


Figura 1: Resultados obtidos com o modelo proposto. (a) Comparação entre os dados de conversão previstos e os dados experimentais do branco. (b-c) Perfis temporais de massas molares.

### 3. Estimação de parâmetros

Tendo em vista o bom desempenho do modelo proposto para as condições experimentais do branco, o mesmo foi utilizado para descrever o efeito da cúrcuma na polimerização em massa do MMA. Como já foi comentado anteriormente, a cúrcuma foi incluída no modelo cinético como agentes de terminação e de transferência de cadeia. Uma vez que não há na literatura dados cinéticos para esse tipo de modelo, pretende-se nessa seção estimar os parâmetros cinéticos dessas equações, que são o fator pré-exponencial e a energia de ativação de cada constante cinética.

O problema de estimação de parâmetros é dividido em três etapas. O primeiro passo é definir uma função objetivo, também conhecida como métrica adequada para o problema. O segundo passo consiste em achar o ponto de ótimo da métrica proposta, que pode ser um ponto de máximo ou mínimo. Por fim, deve-se fornecer uma interpretação estatística dos parâmetros obtidos e da qualidade da previsão efetuada com o auxílio do modelo (PINTO and SCHWAAB,

2007).

A definição da função objetivo foi realizada a partir do Método dos mínimos quadrados. Este método admite a flutuação normal das medidas, medidas independentes de cada variável e ausência de erro significativo nas variáveis independentes. Deve-se assumir ainda a hipótese do modelo perfeito (o modelo é perfeito se é capaz de descrever exatamente as relações existentes entre as variáveis do problema) e a hipótese do experimento bem feito (diz-se que o experimento é bem feito se os erros de medição cometidos durante a condução dos erros experimentais são equivalentes ao conteúdo mínimo de erro admissível para o processo de medição) (PINTO and SCHWAAB, 2007). A função objetivo utilizada foi a seguinte:

$$F_{obj} = \sum_{i=1}^{NE} \sum_{j=1}^{NY} (y_i^e - f_j(x_i^e, a))^2 \quad (21)$$

Este modelo tem  $NP$  parâmetros,  $a^T = [a_1 a_2 \cdots a_{NP}]$ , associados a  $NY$  funções não lineares,  $f_j(x)$ , que transforma as  $NX$  variáveis independentes,  $x^T = [x_1 x_2 \cdots x_{NX}]$ , nas  $NY$  variáveis dependentes,  $y^T = [y_1 y_2 \cdots y_{NY}]$ . Cada uma das variáveis independentes e dependentes é medida em cada uma das  $NE$  condições experimentais.

Os valores dos parâmetros encontrados com estimação estão resumidos na Tabela 3 e, os resultados de conversão e massa molar obtidos após a estimação são apresentados na Figura 2. Verifica-se que as curvas de conversão obtidas pelo modelo se encaixam perfeitamente nos dados experimentais, mostrando o bom desempenho do modelo. Entretanto, quando observamos as massas molares o mesmo não acontece. O modelo distancia-se bastante dos dados experimentais, indicado que a cúrcuma não está agindo apenas como agentes de transferência e terminação de cadeia. Sendo assim, pretende-se no decorrer desta tese, propor uma nova abordagem para tratar o efeito da cúrcuma na polimerização do MMA. A interpretação estatística dos parâmetros obtidos, também será feita posteriormente.

Tabela 3: Parâmetros obtidos com a estimação de parâmetros.

Parâmetro	Símbolo	Valor
Fator pré-exponencial (transferência)	$k_{0ICU}$	$1,5 \cdot 10^3$
Fator pré-exponencial (terminação)	$k_{0CCU}$	$1,8 \cdot 10^7$
Energia de ativação (transferência)	$E_{atCU}$	$1,0 \cdot 10^3$
Energia de ativação (terminação)	$E_{aCCU}$	$1,65 \cdot 10^3$

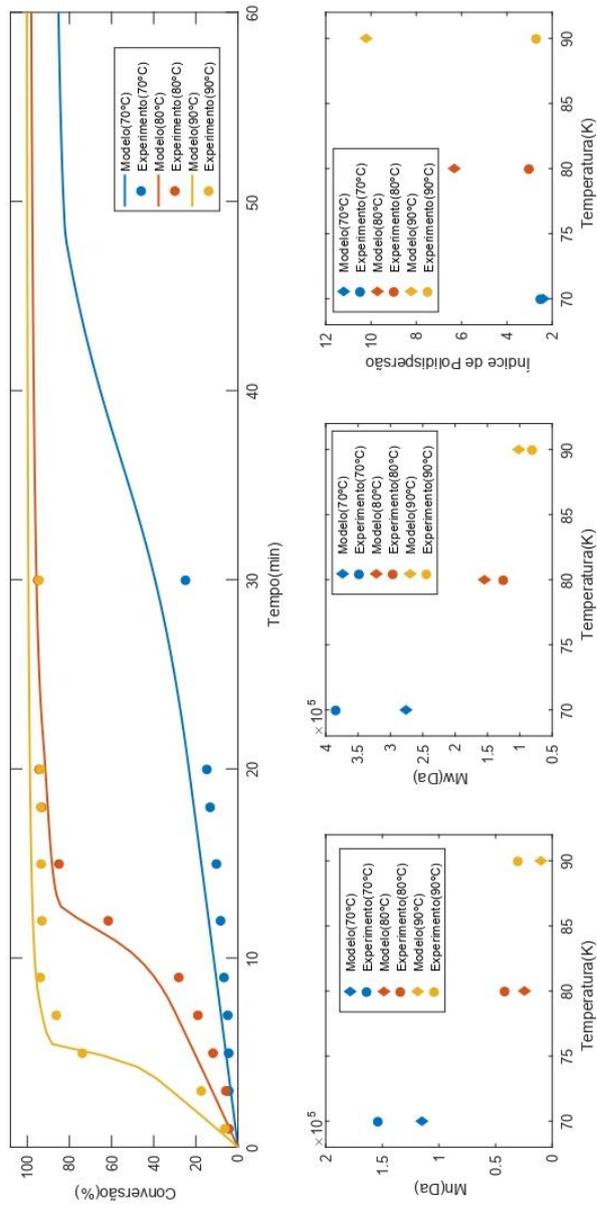


Figura 2: Comparação entre os dados experimentais e o dados previstos pelo modelo proposto. (a) Conversão; (b-c) Massas molares e (d) Índice de polidispersão.

## Referências

- ACHILIAS, D., KIPARISSIDES, C., 1988, "Modeling of Diffusion-Controlled Free-Radical Polymerization Reactions", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 35, pp. 1303–1323.
- ODIAN, G., 2004, *Principles of polymerization*. Fourth ed. New York. ISBN: 3175723993.
- PINTO, J., RAY, W., 1995, "The dynamic behavior of continuous solution polymerization reactors - VII: experimental study of a copolymerization reactor", *Chemical Engineering Science*, v. 50, n. 4, pp. 715–736.
- PINTO, J., SCHWAAB, M., 2007, *Análise de dados experimentais I – Fundamentos de estatística e estimação de parâmetros*. Série Escola Piloto em Engenharia Química COPPE/UFRJ.
- TEFERA, N., WEICKERT, G., WESTERTEP, K., 1997, "Modeling of Free Radical Polymerization up to High Conversion. II. Development of a Mathematical Model", *Journal of Applied Polymer Science*, v. 63, pp. 1663–1680.

### Apêndice B - Reparametrização do planejamento fatorial completo a três níveis

Seja um planejamento experimental completo a três níveis para duas variáveis, considerando os níveis normalizados -1, 0 e +1, definido pelo modelo genérico apresentado pela Equação Ap-1, obtém-se a matriz de efeitos apresentada pela Tabela Ap-1. Nota-se que o plano experimental não é mais balanceado, pois cada parâmetro é estimado com diferentes níveis de precisão. Assim, o plano também perde a ortogonalidade. Ambas as propriedades foram perdidas pela inclusão dos termos quadráticos.

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 z_1 + \alpha_2 z_2 + \alpha_3 z_1 z_2 + \alpha_4 z_1^2 + \alpha_5 z_2^2 + \alpha_6 z_1^2 z_2 + \alpha_7 z_1 z_2^2 + \alpha_8 z_1^2 z_2^2 \quad \text{Equação Ap-1}$$

**Tabela Ap-1.** Matriz de efeitos do planejamento fatorial completo  $3^2$  considerando modelo genérico

Exp	c	$z_1$	$z_2$	$z_1 z_2$	$z_1^2$	$z_2^2$	$z_1^2 z_2$	$z_1 z_2^2$	$z_1^2 z_2^2$
1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	1	1	0	0	1	0	0	0	0
3	1	1	-1	-1	1	1	-1	1	1
4	1	0	1	0	0	1	0	0	0
5	1	0	0	0	0	0	0	0	0
6	1	0	-1	0	0	1	0	0	0
7	1	-1	1	-1	1	1	1	-1	1
8	1	-1	0	0	1	0	0	0	0
9	1	-1	-1	1	1	1	-1	-1	1
$\Sigma$	9	0	0	0	6	6	0	0	4

Para evitar este problema, é proposta a inserção da constante  $\lambda$ , no formato apresentado pela Equação Ap-2. Portanto,  $\lambda$  deve ser definido de forma que a Equação Ap-3 seja atendida, resultando em uma matriz de efeitos diagonal. Para tal,  $\lambda$  deve assumir o valor de  $2/3$ , resultando na matriz de efeitos apresentada pela Tabela Ap-2. Assim, a identificação independente dos parâmetros é possível, embora não balanceada.

$$f(z) = (z^2 - \lambda) \quad \text{Equação Ap-2}$$

$$y = \alpha_0 + \alpha_1 z_1 + \alpha_2 z_2 + \alpha_3 z_1 z_2 + \alpha_4 (z_1^2 - \lambda) + \alpha_5 (z_2^2 - \lambda) + \alpha_6 (z_1^2 - \lambda) z_2 + \alpha_7 z_1 (z_2^2 - \lambda) + \alpha_8 (z_1^2 - \lambda) (z_2^2 - \lambda) \quad \text{Equação Ap-3}$$

**Tabela Ap-2.** Matriz de efeitos do planejamento fatorial completo  $3^2$  considerando modelo reparametrizado.

Exp	c	$z_1$	$z_2$	$z_1.z_2$	$(z_1^2-2/3)$	$(z_2^2-2/3)$	$(z_1^2-2/3)z_2$	$z_1(z_2^2-2/3)$	$(z_1^2-2/3).(z_2^2-2/3)$
1	1	1	1	1	1/3	1/3	1/3	1/3	1/9
2	1	1	0	0	1/3	- 2/3	0	- 2/3	- 2/9
3	1	1	-1	-1	1/3	1/3	- 1/3	1/3	1/9
4	1	0	1	0	- 2/3	1/3	- 2/3	0	- 2/9
5	1	0	0	0	- 2/3	- 2/3	0	0	4/9
6	1	0	-1	0	- 2/3	1/3	2/3	0	- 2/9
7	1	-1	1	-1	1/3	1/3	1/3	- 1/3	1/9
8	1	-1	0	0	1/3	- 2/3	0	2/3	- 2/9
9	1	-1	-1	1	1/3	1/3	- 1/3	- 1/3	1/9
$\Sigma$	9	0	0	0	0	0	0	0	0

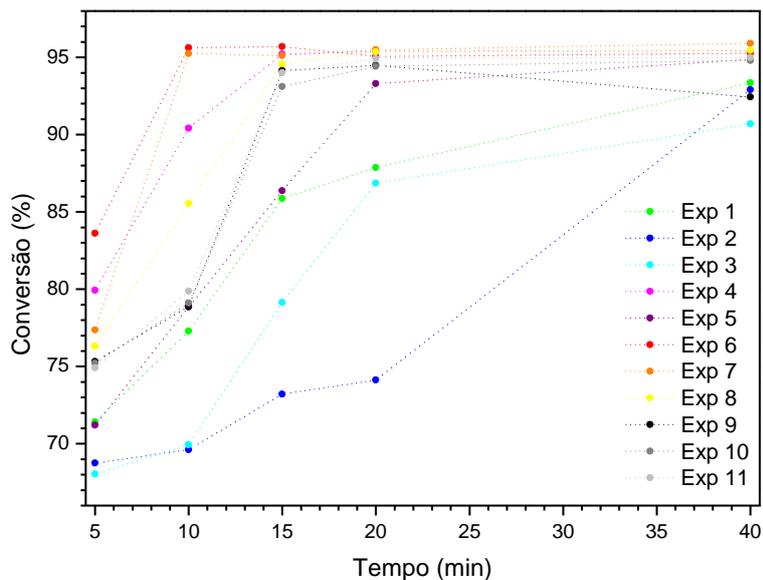
Vale destacar que a ortogonalidade de um plano fatorial está intimamente ligada com a qualidade do modelo matemático empregado para a interpretação dos efeitos. Além disso, a forma com que o modelo matemático é escrito também influencia a ortogonalidade de um plano, já que a inserção da constante  $\lambda$  não altera a qualidade das previsões do modelo; ou seja, é o mesmo modelo apenas reescrito em uma forma reparametrizada.

# **ANEXOS**

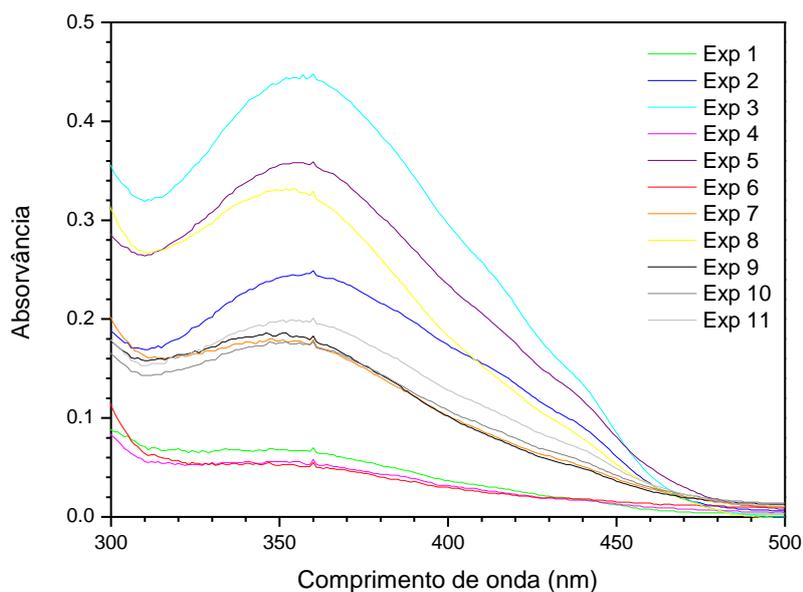
## ANEXOS CAPÍTULO III

### Anexo A - Caracterizações amostras planejamento experimental

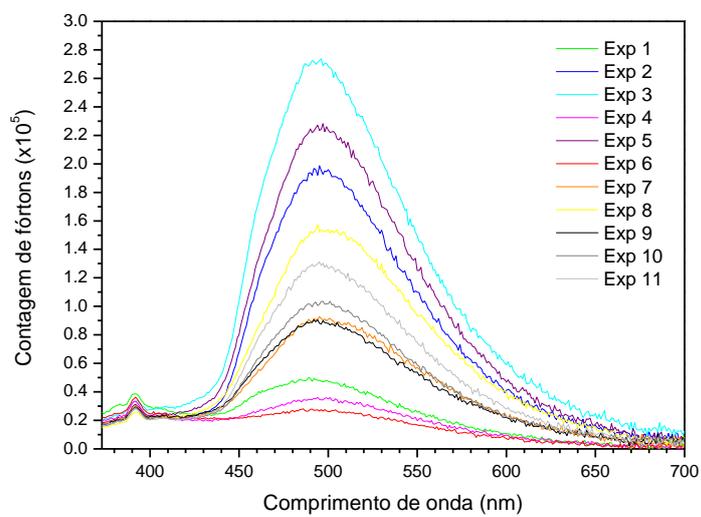
**Figura A-1.** Curvas cinéticas para os experimentos de polimerização em massa, em que foram variados o teor de iniciador e a carga de extrato de cúrcuma, compondo o planejamento experimental completo 3<sup>2</sup>.



**Figura A-2.** Espectros de absorção das amostras do planejamento experimental completo 3<sup>2</sup>, solubilizadas em THF (4,5 mg g<sup>-1</sup>).

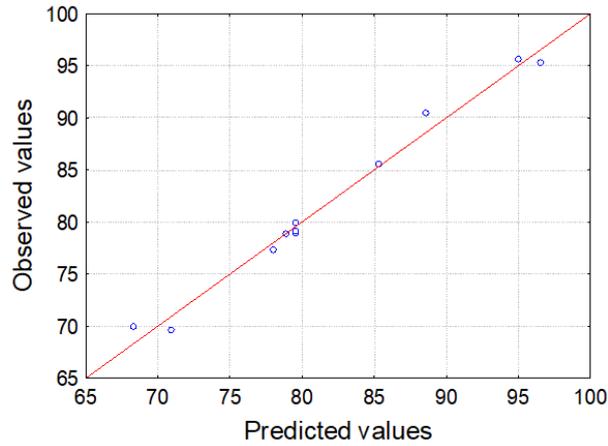


**Figura A-3.** Espectros de emissão (excitação a 352 nm) das amostras do planejamento experimental completo  $3^2$ , solubilizadas em THF ( $4,5 \text{ mg g}^{-1}$ ).

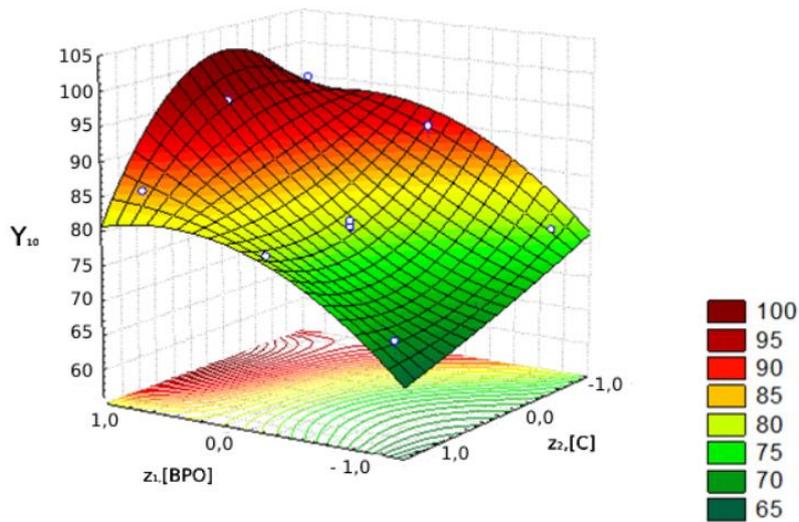


## Anexo B - Análises detalhadas dos ajustes do modelo empírico

**Figura B-1.** Valores de rendimento ( $Y_{10}$ ) previstos e calculados.



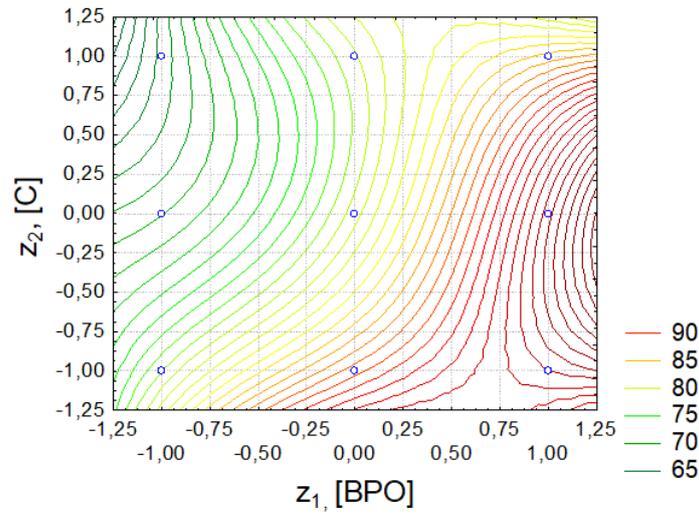
**Figura B-2.** Superfície de resposta para rendimento ( $Y_{10}$ ).



**Tabela B-1.** Parâmetros de modelo estimados para rendimentos ( $Y_{10}$ ).

Parâmetro	$\alpha_0$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_7$	$\alpha_8$
Estimativa	82,357	9,932	-4,835	-4,333	-6,256
Erro	0,430	0,556	0,556	1,181	1,556
p-level	0,000	0,000	0,000	0,010	0,007

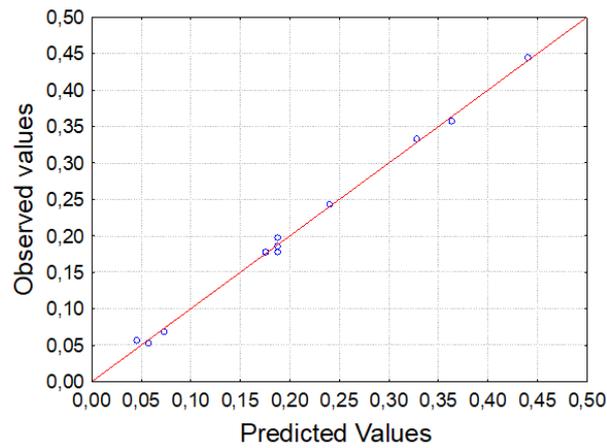
**Figura B-3.** Níveis de resposta para rendimentos ( $Y_{10}$ ).



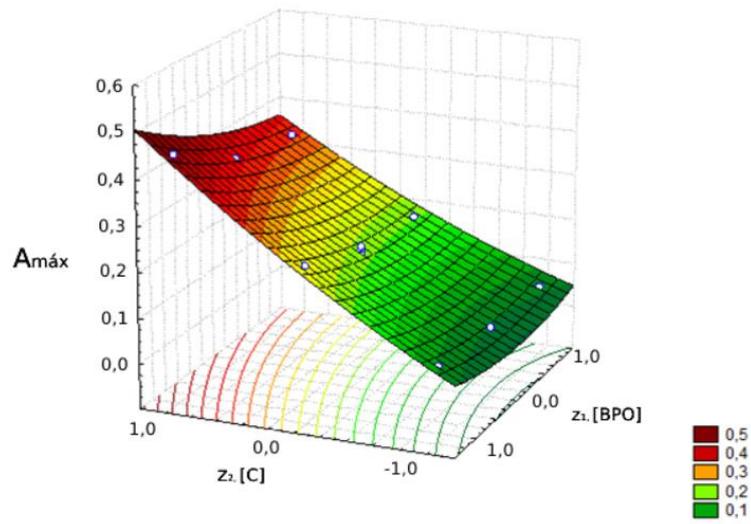
**Tabela B-2.** Parâmetros de modelo estimados para fluorescência ( $A_{max}$ ).

Parâmetro	$\alpha_0$	$\alpha_1$	$\alpha_2$	$\alpha_3$	$\alpha_4$	$\alpha_5$
<b>Estimativa</b>	0,213	-0,032	0,159	-0,024	0,020	0,017
<b>Erro</b>	0,003	0,004	0,004	0,005	0,006	0,006
<b>p-level</b>	0,000	0,000	0,000	0,004	0,019	0,037

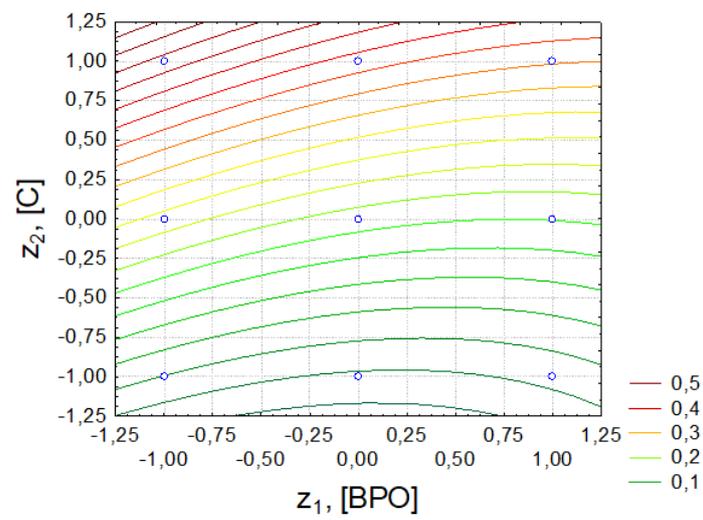
**Figura B-4.** Valores de fluorescência ( $A_{max}$ ) previstos e calculados.



**Figura B-5.** Superfície de resposta para fluorescência ( $A_{\max}$ ).



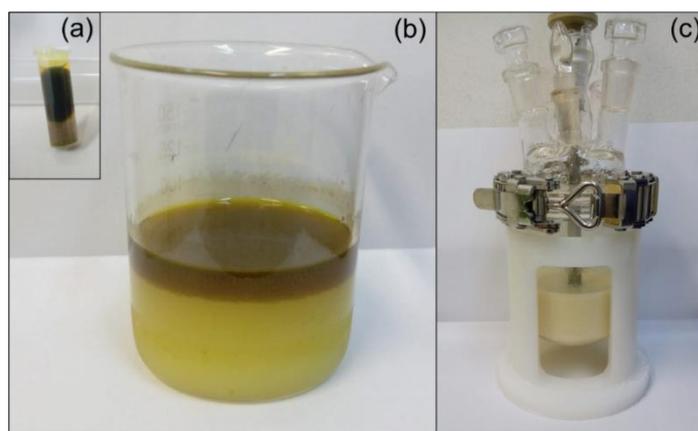
**Figura B-6.** Níveis de resposta para fluorescência ( $A_{\max}$ ).



## ANEXOS CAPÍTULO V

### Anexo C - Validação da síntese

**Figura C-1.** Aspecto visual da miniemulsão com 1,0% de SPIONs: (a) pré-emulsão; (b) pós-emulsão e repouso, (c) pós-emulsão e polimerização. A concentração de 1,0% de SPIONs (em relação ao monômero) mantém a estabilidade da fase aquosa/orgânica ao incorporar os SPIONs à matriz polimérica.



### Anexo D - Ensaio biológicos

**Figura D-1.** Micrografia óptica após 24 h de exposição dos nanossistemas M@P<sub>c</sub> e M@PP<sub>c</sub> à linhagem celular SAOS2.

