

UNIVERSIDADE DO VALE DO PARAÍBA
INSTITUTO DE PESQUISA E DESENVOLVIMENTO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA BIOMÉDICA

Giulia Capizzani Gonçalves

**Síntese e Caracterização de SPIONs@APTES Conjugados com Clorina E6 via
Química Carbodiimida para Terapia Fotodinâmica**

Synthesis and characterization of SPIONs@APTES conjugated with chlorin E6 via
carbodiimide for photodynamic therapy

São José dos Campos

2025

Giulia Capizzani Gonçalves

**Síntese e Caracterização de SPIONs@APTES Conjugados com Clorina E6 via
Química Carbodiimida para Terapia Fotodinâmica**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro José Raniero

São José dos Campos

2025

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Gonçalves, Giulia Capizzani

Síntese e caracterização de SPIONs@APTES conjugados com clorina E6 via química carbodiimida para terapia fotodinâmica / Giulia Capizzani Gonçalves; orientador, Prof. Dr. Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2025.

71 p.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica.

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Nanopartículas Magnéticas de Óxido de Ferro. 3. Fotoquimioterapia. 4. Câncer. I. Raniero, Prof. Dr. Leandro José, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Giulia Capizzani Gonçalves, autor(a) da obra acima referenciada:

Autorizo a divulgação total ou parcial da obra impressa, digital ou fixada em outro tipo de mídia, bem como, a sua reprodução total ou parcial, devendo o usuário da reprodução atribuir os créditos ao autor da obra, citando a fonte.

Declaro, para todos os fins e efeitos de direito, que o Trabalho foi elaborado respeitando os princípios da moral e da ética e não violou qualquer direito de propriedade intelectual sob pena de responder civil, criminal, ética e profissionalmente por meus atos.

São José dos Campos, 22 de Setembro de 2025.

Giulia Capizzani Gonçalves

Autor(a) da Obra

Data da defesa: _____ / _____ / _____
18 08 2025

GIULIA CAPIZZANI GONÇALVES

**“Síntese e Caracterização de SPIONs@APTES Conjugados com Clorina E6
via Química Carbodiimida para Terapia Fotodinâmica”**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre, do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento da Universidade do Vale do Paraíba - Univap, pela seguinte banca examinadora:

Prof. ^a Dr. ^a Cristina Pacheco Soares	<i>Cristina Pacheco Soares</i>
Prof. ^a Dr. ^a Andrea Santos Liu - IFSP	<i>Andrea Santos Liu</i>
Prof. Dr. Leandro José Raniero	<i>Leandro José Raniero</i>

Prof.^a Dr.^a Juliana Ferreira Strixino

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 18 de agosto de 2025.

Agradeço a Deus por todo cuidado, amor e coragem que recebo diariamente e principalmente durante o desenvolvimento deste trabalho. Dedico este trabalho a toda minha família e amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar o dom da vida e por me permitir acreditar que tudo vai dar certo, mesmo quando tudo sugere o contrário. A toda minha família, meus pais e padrasto por todo amor, cuidado, ajuda, suporte e carinho ao longo dessa caminhada. Amo vocês!

Ao meu namorado que esteve presente e me dando todo o suporte em todos os momentos, seu apoio foi fundamental! Obrigada pelo amor e carinho, e principalmente por ser essa pessoa maravilhosa, um presente muito especial na minha vida, num momento em que não acreditava ser possível! Me faltam palavras para dizer e expressar o quão importante você é para mim. Obrigada por me fazer tão feliz! Amo você.

A todos meus amigos que me ouviram sempre que precisei, me incentivaram e estiveram comigo ao longo deste período e sempre. Em especial à minha pessoa, minha irmã escolhida pela vida, obrigada por sempre estar comigo, por dividir todos os momentos, bons e ruins, e por ser meu porto seguro. Muito obrigada por sempre estar aqui por mim!

A todos do Laboratório de Nanossensores, alunos de Mestrado e de Iniciação científica que sempre estiveram dispostos a me ajudar, me aconselharam e se tornaram uma segunda família. Um agradecimento em especial a todas à Nathanne e à Marcela que estiveram presente no início da minha trajetória acadêmica desde a Iniciação Científica até esta fase. Obrigada pela amizade que construímos, por todos os cafés, e por compartilharem seus conhecimentos comigo e por sempre me incentivarem.

A todos os meus amigos de outros laboratórios, pela amizade criada, pelos almoços, pelas conversas de corredor, risadas e bons momentos cheios de alegria e mesmo dividindo nossas angústias e preocupações, sempre terminando nossas conversas com muito apoio e carinho.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Raniero, meu sincero agradecimento por ter me acolhido em seu laboratório no início de minha graduação e estar comigo até aqui. Obrigada por compartilhar seu conhecimento, pela atenção, disponibilidade e por acreditar em mim, muitas vezes mais do que eu mesma acreditava. Agradeço todas as correções, sugestões e até as broncas, que só depois entendi a importância. Por toda a paciência de me ensinar mil vezes a mesma coisa, por me

apresentar ao universo da nanotecnologia, e pelo carinho, apoio, conversas, almoços e cafés. Tenho muita admiração pelo pesquisador e pela pessoa que você é, e espero um dia ser uma cientista como você. Obrigada por ser exemplo e meu “pai científico”.

Agradeço a todos os funcionários do IP&D – direção, secretaria, portaria e limpeza – pelo trabalho e dedicação em manter o nosso ambiente de trabalho sempre acolhedor, e também às faculdades e biblioteca central, que com certeza fizeram parte desse caminho trilhado com tanto carinho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, que de alguma forma me ajudaram a tomar decisões importantes. À professora Cristina Pacheco, obrigada por toda a ajuda e colaboração que trouxe tanto conhecimento.

À Universidade do Vale do Paraíba, pela infraestrutura e oportunidades, e a todos os profissionais incríveis com quem pude aprender um pouco a cada dia.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida (Número do Processo: 88887.908254/2023-00).

Por fim agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

Nada disso seria possível sem a colaboração, o carinho e o apoio de cada um de vocês.

A todos, muito obrigada.

"O conhecimento é uma aventura eterna na borda do mistério."

(Arthur Koestler)

A cada resposta, a ciência nos presenteia com novas dúvidas, convidando-nos a recomeçar o ciclo da descoberta, e apesar dos obstáculos e empecilhos, encontrei em cada desafio uma oportunidade de superação e crescimento.

RESUMO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e continua sendo um grande desafio para os sistemas de saúde, principalmente em países com poucos recursos. Os tratamentos tradicionais, como cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia hormonal, ainda são amplamente utilizados, mas apresentam limitações importantes, como baixa seletividade e efeitos colaterais severos. Com os avanços no entendimento dos mecanismos do câncer, novas terapias mais específicas e menos agressivas estão sendo desenvolvidas destacando-se a Terapia Fotodinâmica (TFD). Apesar das vantagens, como menor toxicidade e maior precisão, a TFD ainda enfrenta problemas, principalmente relacionados à baixa solubilidade e instabilidade dos fotossensibilizadores. Para minimizar essas limitações, o uso de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) têm se destacado por sua biocompatibilidade, estabilidade, baixo custo e possibilidade de serem modificadas para se ligarem a moléculas específicas. Uma estratégia promissora é a incorporação da Clorina E6 (Ce6) às SPIONs. A Ce6 tem alta eficácia e baixa toxicidade, mas sua baixa solubilidade compromete seu uso. Neste contexto, essa dissertação propõe a síntese e a caracterização de SPIONs pelo método de coprecipitação, a síntese e caracterização de nanossondas funcionalizadas com o fotossensibilizador Ce6 e sua aplicação na TFD. As dimensões das nanoestruturas foram caracterizadas por diâmetro hidrodinâmico, estabilidade coloidal e composição química. Posteriormente foram realizados estudos *in vitro* para avaliação da atividade antitumoral e toxicológica da TFD na linhagem celular de glioblastoma humano (M059J).

Palavras-chave: SPIONs, Nanossonda, Terapia Fotodinâmica, Clorina E6, Câncer.

ABSTRACT

Cancer is one of the leading causes of death worldwide and remains a major challenge for healthcare systems, especially in low-resource countries. Traditional treatments such as surgery, chemotherapy, radiotherapy, and hormone therapy are still widely used, but they present important limitations, including low selectivity and severe side effects. With advances in understanding the molecular mechanisms of cancer, new, more specific and less aggressive therapies are being developed. Among these, Photodynamic Therapy (PDT) stands out. Despite its advantages, such as lower toxicity and greater precision, PDT still faces challenges, mainly related to the low solubility and instability of photosensitizers. To minimize these limitations, the use of superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) has gained attention due to their biocompatibility, stability, low cost, and ability to be functionalized with specific molecules. One promising strategy is the incorporation of Chlorin e6 (Ce6) into SPIONs. Ce6 has high efficacy and low toxicity, but its poor solubility compromises its application. In this context, this dissertation proposes the synthesis and characterization of SPIONs via the coprecipitation method, the synthesis and characterization of nanoprobes functionalized with the photosensitizer Ce6, and their application in PDT. The nanostructures were characterized in terms of hydrodynamic size, colloidal stability, and chemical composition. Subsequently, *in vitro* studies were conducted to evaluate the antitumor and toxicological activity of PDT in the human glioblastoma cell line (M059J).

Keywords: SPIONs, Nanoprobes, Photodynamic Therapy, Chlorin E6, Cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Escala de tamanhos comparando nanomateriais naturais e sintéticos com organismos e estruturas biológicas.	20
Figura 2 - Estrutura Cristalina da Magnetita, Maghemita e Hematita	21
Figura 3 - Morfologias de partículas.	23
Figura 4 - Esquema da reação de formação de Fe_3O_4	24
Figura 5 - Estrutura molecular do APTES.	27
Figura 6 - Representação da modificação química das SPIONs com APTES .	28
Figura 7 - Representação do mecanismo da TFD em câncer cerebral	31
Figura 8 - Estrutura molecular da Clorina E6.	33
Figura 9 - Representação da reação de formação da amida.	37
Figura 10 - Distribuição de tamanho e de potencial elétrico das SPIONs	45
Figura 11 - Distribuição de tamanho e de potencial elétrico das SPIONs@APTES.....	46
Figura 12 - Caracterização por Espectroscopia UV-visível da curva de pH das SPIONs@APTES.	46
Figura 13 - Caracterização por Espectroscopia de correlação de fótons com e sem potencial da curva de pH das SPIONs@APTES.	47
Figura 14 - Curva de calibração Padrões de Ferro	48
Figura 15 - Espectros de FT-IR das SPIONs, SPIONs@APTES e APTES.	49
Figura 16 - Espectro UV-visível das Nanossondas e da Ce6.....	50
Figura 17 - Distribuição de tamanho e de potencial elétrico das Nanossondas.	50
Figura 18 - Espectro de FT-IR das Nanossondas.	52
Figura 19 - Espectro comparativo da emissão de Fluorescência Nanossondas com a Ce6.	53
Figura 20 - Análise do tempo de incorporação das nanossondas na linhagem celular M059J.	53
Figura 21 – Análise de MTT da Linhagem celular M059J	54
Figura 22 - Análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com Azul de Tripán	55
Figura 23 – Grupo Controle no Método de exclusão com Azul de Tripán	55

Figura 24 – Grupo com aplicação da nanossonda no Método de exclusão com Azul de Tripán	56
Figura 25 - Análise da viabilidade celular pelo ensaio de resazurina.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APTES – 3-aminopropiltriétoxisilano

Ce6 – Clorina e6

CO₂ – Dióxido de carbono

DLS - Espalhamento Dinâmico da Luz, do Inglês “Dynamic Light Scattering”

DMSO - Dimetilsulfóxido

EDC – (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)) carbodiimida

EROs - Espécies Reativas de Oxigênio

FT-IR - Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, do Inglês “Fourier Transform Infrared Spectroscopy”

GBM – Glioblastoma Multiforme

GCO – Observatório Global de Câncer, do inglês *Global Cancer Observatory*

INCA - Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva

IONPs – Nanopartículas de Óxido de Ferro, do inglês *Iron Oxide Nanoparticles*

ISO - Organização Internacional de Normalização, do Inglês *International Organization for Standardization*

LEDs - Diodos emissores de luz, do inglês “Light emitting diodes”

NIR - Infravermelho próximo, do Inglês “Near Infrared”

PBS – Tampão Fosfato Salino, do inglês *Phosphate Saline Buffer*

SPIONs - Nanopartículas Superparamagnéticas de Óxido de Ferro, do Inglês “Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles”

Sulfo-NHS N hydroxysulfosuccinimide

TFD – Terapia Fotodinâmica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
1.1	OBJETIVOS	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1	Nanotecnologia e Nanomateriais	19
2.2	Nanopartículas de Óxido de Ferro	20
2.3	Síntese de Nanopartículas de Óxido de Ferro pelo Método de Coprecipitação Química	23
2.4	Estabilização das Nanopartículas de Óxido de Ferro	25
2.5	Câncer Cerebral	28
2.6	Terapia Fotodinâmica	30
2.7	Clorina E6	32
2.8	Nanossondas	34
3	MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1	Síntese das SPIONs	36
3.2	Síntese da Nanossonda e Modificação Química Via Carbodiimida	37
3.3	Caracterização dos Nanomateriais	38
3.3.1	Análise de Espectroscopia de UV-visível	38
3.3.2	Análise de DLS	38
3.3.3	Análise de Potencial Zeta	38
3.3.4	Análise de FT-IR	39
3.3.5	Análise de pH	39
3.3.6	Quantificação de Ferro	39
3.3.7	Análise de Fluorescência	40
3.4	Cultura Celular da Linhagem M059J	40
3.5	Análise do Tempo de Internalização das Nanossondas	41
3.6	Ensaio de Terapia Fotodinâmica em Cultura Celular	41
3.7	Ensaio de Citotoxicidade das Nanossondas	42
4	RESULTADOS	44
4.1	Caracterização das SPIONs e SPIONs@APTES	44
4.2	Caracterização das Nanossondas	49
5	DISCUSSÃO	57

6	CONCLUSÕES.....	65
	REFERÊNCIAS	66

1 INTRODUÇÃO

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo e representa um enorme desafio para os sistemas de saúde, especialmente em países com recursos limitados. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) indicam que, em 2022, mais de 20 milhões de novos casos foram diagnosticados e aproximadamente 10 milhões de pessoas morreram devido à doença (International Agency for Research on Cancer, 2024; World Health Organization, 2022). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é o principal órgão responsável pela coleta e divulgação de estatísticas sobre o câncer. Segundo o INCA, essa enfermidade é o principal problema de saúde pública no país e está entre as duas primeiras causas de morte prematura em indivíduos com menos de 70 anos (Instituto Nacional de Câncer, 2022a).

Diante da alta incidência e dos elevados índices de mortalidade, o tratamento do câncer é um dos maiores desafios da medicina moderna. Tradicionalmente, as principais modalidades terapêuticas incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal, muitas vezes utilizadas em combinação (Zhao *et al.*, 2016). Contudo, esses métodos convencionais apresentam limitações significativas, tais como efeitos colaterais marcantes e baixa seletividade, o que pode levar ao dano de tecidos saudáveis.

Com o avanço da compreensão dos mecanismos moleculares do câncer, novas abordagens terapêuticas vêm sendo desenvolvidas com o objetivo de destruir as células tumorais de forma mais específica e menos invasiva. Essas novas estratégias buscam reduzir os efeitos colaterais e melhorar a qualidade de vida dos pacientes, representando um passo importante na evolução do tratamento oncológico (Chen *et al.*, 2024).

Neste cenário, a Terapia Fotodinâmica (TFD) surge como uma abordagem terapêutica inovadora e promissora, altamente eficaz e não invasiva. Uma técnica que se fundamenta na ativação de fotossensibilizadores (FS) por uma fonte de luz de comprimento de onda adequado, em presença de oxigênio molecular, resultando na formação de espécies reativas de oxigênio (EROs). Essas espécies altamente reativas promovem a destruição de células tumorais, o colapso da vasculatura

tumoral e a ativação de respostas imunológicas locais (Zhou *et al.*, 2023). Entre as vantagens da TFD destacam-se a alta seletividade para tecidos-alvo, a baixa toxicidade sistêmica e a possibilidade de múltiplas aplicações sem indução de resistência. No entanto, ainda persistem limitações técnicas, como a baixa solubilidade de muitos FSs, sua instabilidade à luz ambiente e a distribuição não seletiva no organismo (Li *et al.*, 2023).

Para minimizar essas limitações e ampliar o potencial terapêutico da TFD, diversas estratégias baseadas em nanotecnologia vêm sendo desenvolvidas. Nesse contexto, as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro (Iron Oxide Nanoparticles – IONPs), especialmente na forma superparamagnética (SPIONs), têm se destacado por sua elevada biocompatibilidade, estabilidade química, custo acessível e notável capacidade de funcionalização superficial com biomoléculas (Fathy *et al.*, 2021). Essas propriedades tornam as SPIONs promissoras em uma ampla gama de aplicações biomédicas, incluindo liberação controlada de fármacos, hipertermia magnética, separação celular, diagnóstico por imagem e como plataformas teranósticas (Affatigato *et al.*, 2023; Elbially; Aboushoushah; Alshammari, 2019).

A incorporação de fotossensibilizadores como a Clorina E6 (Ce6) em SPIONs representa uma estratégia eficaz para superar algumas limitações intrínsecas à TFD. A Ce6 é um FS de segunda geração que apresenta maior capacidade fototóxica, menor toxicidade no escuro e rápida depuração do organismo quando comparada aos compostos da primeira geração (Amirshaghghi *et al.*, 2019; Domka *et al.*, 2023). Contudo, sua baixa solubilidade em água favorece a agregação em meio fisiológico, o que compromete sua distribuição nos tecidos e reduz a eficiência na geração de EROs (Hak *et al.*, 2023).

A associação entre Ce6 e SPIONs permite melhorar sua estabilidade, aumentar sua solubilidade e promover um direcionamento mais eficaz ao tecido tumoral, especialmente quando combinada com estratégias de magneto-orientação. Isso não apenas amplia a eficácia da TFD, como também reduz os efeitos adversos sistêmicos, contribuindo para um tratamento mais seguro e eficiente. Neste contexto, nesta dissertação foi proposta a síntese e caracterização de nanossondas funcionalizadas com a Ce6 a partir de nanopartículas de óxido de ferro e sua aplicação em terapia fotodinâmica *in vitro* na linhagem celular de glioblastoma.

1.1 OBJETIVOS

Os objetivos gerais foram:

- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de óxidos de ferro estabilizadas com o organosilano 3-aminopropiltrietoxisilano (APTES) e funcionalizar com o fotossensibilizador (FS) Clorina E6 (Ce6) via química Carbodiimida;
- Aplicar as nanossondas *in vitro* na linhagem celular de glioblastoma humano (M059J).

Os objetivos específicos são:

- a) Sintetizar as SPIONs e caracterizar o diâmetro hidrodinâmico e o Potencial Zeta por meio da técnica Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS, *Dynamic Light Scattering*).
- b) Estabilizar as SPIONs com APTES e caracterizá-las pelas técnicas de Espectroscopia UV-visível, DLS e Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR).
- c) Estudo de estabilidade das SPIONs@APTES em função do pH do meio para estudo e realização da modificação química via Carbodiimida.
- d) Funcionalizar as SPIONs@APTES ao FS (Ce6) para a obtenção das nanossondas e caracterizá-las pelas técnicas de Espectroscopia UV-visível, Espectroscopia de Fluorescência, DLS e FT-IR.
- e) Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade das nanossondas na linhagem celular M059J e verificar sua eficiência no uso da terapia fotodinâmica (TFD).

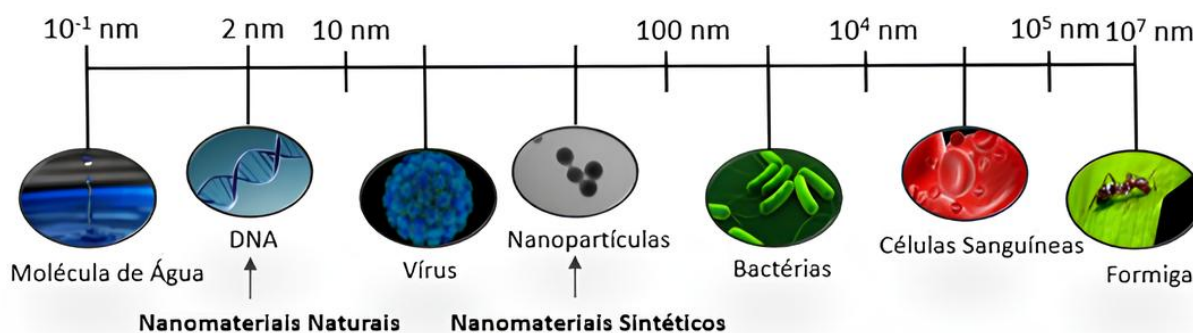
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 NANOTECNOLOGIA E NANOMATERIAIS

Nanotecnologia é uma especialidade da ciência e da engenharia, que se insere em um contexto mais amplo da tecnologia. É entendida como aplicação sistemática do conhecimento científico para desenvolvimento de soluções práticas e inovadoras, e dedica-se ao estudo e compreensão, manipulação e aplicação de materiais e estruturas em escala nanométrica, cujas dimensões encontram-se na faixa de 0,1 a 100 nm (Begum *et al.*, 2020; Shabatina *et al.*, 2020). Nessa faixa de tamanho, os materiais podem exibir propriedades físico-químicas significativamente distintas das observadas em suas formas macroscópicas, em virtude de efeitos de superfície e fenômenos quânticos que se tornam predominantes.

Neste contexto, nanomateriais podem ter origem natural ou ser obtidos por processos sintéticos. Entre os naturais, destacam-se as nanoestruturas resultantes da automontagem molecular, assim como nanomateriais intrínsecos a sistemas biológicos, como proteínas, enzimas e o próprio DNA humano. Já os sintéticos são produzidos artificialmente com o objetivo de explorar suas propriedades específicas. Um exemplo, é o dióxido de titânio (TiO_2), que, em escala macroscópica, apresenta coloração branca e é amplamente empregado como pigmento para uniformização de tonalidades. No entanto, quando sintetizado em escala nanométrica, torna-se transparente, característica que viabiliza sua aplicação em formulações de revestimentos ópticos e protetores solares, conferindo proteção contra radiação ultravioleta sem comprometer a estética do produto final (Cândido, 2023). Como ilustrado na Figura 1, esses nanomateriais, sejam naturais ou sintéticos, possuem dimensões que se inserem em uma escala comparativa com diversas estruturas biológicas e organismos visíveis, auxiliando na compreensão de sua magnitude e aplicações.

Figura 1 - Escala de tamanhos comparando nanomateriais naturais e sintéticos com organismos e estruturas biológicas.



Fonte: Cândido (2023).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

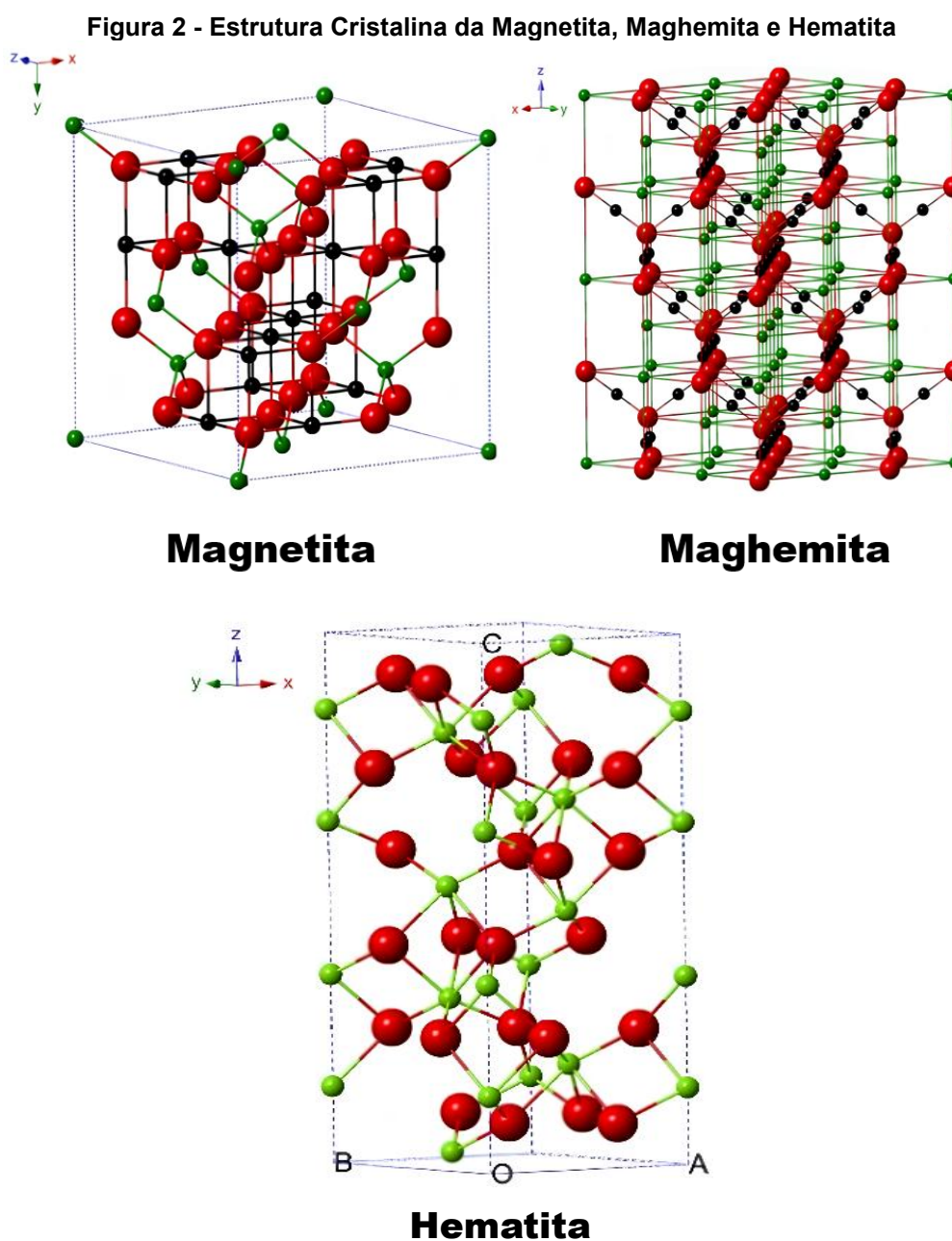
As nanopartículas magnéticas têm se consolidado como uma das classes mais promissoras dentro do vasto espectro de nanomateriais desenvolvidos, impulsionadas por suas propriedades magnéticas únicas e pela ampla aplicabilidade em diferentes áreas da ciência e tecnologia. Essas nanopartículas são comumente compostas por metais como ferro, níquel ou cobalto, bem como seus respectivos óxidos, e apresentam propriedades físico-químicas e magnéticas que possibilitam sua manipulação direcionada por meio de campos magnéticos externos (Ansari *et al.*, 2022).

A funcionalidade e o desempenho dessas estruturas estão diretamente relacionados a características intrínsecas como morfologia, tamanho, estrutura cristalina, composição química e dispersibilidade. Tais parâmetros exercem influência crítica sobre suas propriedades físico-químicas, afetando diretamente a eficiência e adequação desses nanomateriais a diferentes aplicações, especialmente no campo biomédico (Cândido, 2023).

Neste contexto, as nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) têm se destacado significativamente, sobretudo por sua biocompatibilidade elevada, estabilidade química, custo de produção reduzido e pela facilidade de modificação superficial com biomoléculas específicas (Fathy *et al.*, 2021). Essas vantagens têm favorecido sua incorporação em uma variedade de aplicações biomédicas, incluindo seu uso como agentes de contraste em exames de imagem por ressonância magnética, na marcação e separação celular, em terapias baseadas em hipertermia

magnética (Elbially; Aboushousah; Alshammari, 2019), e em plataformas teranósticas, que integram funções terapêuticas e diagnósticas em um único sistema (Affatigato *et al.*, 2023; Wu *et al.*, 2020).

Dentre as principais formas de IONPs, destacam-se a magnetita (Fe_3O_4), a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$), que se diferenciam quanto à composição química, estabilidade, propriedades magnéticas e estrutura cristalina, como apresentado na Figura 2 (Rost, 2021; Santos, 2023).



Fonte: Adaptado de Rost (2021).

A Figura 2 sintetiza as três principais fases cristalinas de óxidos de ferro magnetita (Fe_3O_4), maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). A magnetita adota a estrutura do tipo espinélio inverso com simetria cúbica. Nessa rede, os ânions (O^{2-}) formam um empacotamento cúbico, enquanto os cátions ferro ocupam sítios tetraédricos e octaédricos com ocupação mista de Fe^{2+} e Fe^{3+} . Essa coexistência de estados de oxidação possibilita o “hopping” eletrônico entre Fe^{2+} e Fe^{3+} , conferindo à magnetita elevada magnetização de saturação e comportamento ferrimagnético que, em partículas suficientemente pequenas, pode manifestar-se como superparamagnetismo devido à flutuação térmica dos momentos magnéticos (Cornell; Schwertmann, 2003; Rost, 2021; Wu *et al.*, 2015).

A maghemita é estruturalmente muito próxima à magnetita, conservando um arranjo espinélio cúbico, porém difere por possuir somente ferro trivalente (Fe^{3+}) e uma rede com vacâncias catiônicas distribuídas. Essas vacâncias alteram ligeiramente os parâmetros de rede e as intensidades/posições dos picos, de modo que magnetita e maghemita são frequentemente confundíveis sem análise detalhada ou refinamento; contudo, do ponto de vista funcional, a ausência de Fe^{2+} e as vacâncias reduzem a magnetização comparada à magnetita, produzindo mudanças na resposta magnética e opticamente uma tonalidade mais marrom-avermelhada (Cornell; Schwertmann, 2003; Rost, 2021; Wu *et al.*, 2015).

A hematita apresenta uma topologia estrutural distinta: sua rede é do tipo coríndrica/hexagonal (estrutura α , muitas vezes descrita como coríndon) e a organização dos ânions e cátions não se aproxima do espinélio. Essa diferença geométrica implica propriedades magnéticas fundamentalmente distintas — a hematita é tipicamente antiferromagnética, com fraca magnetização remanescente em certas condições, e mostra baixa magnetização de saturação à temperatura ambiente e coloração avermelhada característica (Cornell; Schwertmann, 2003).

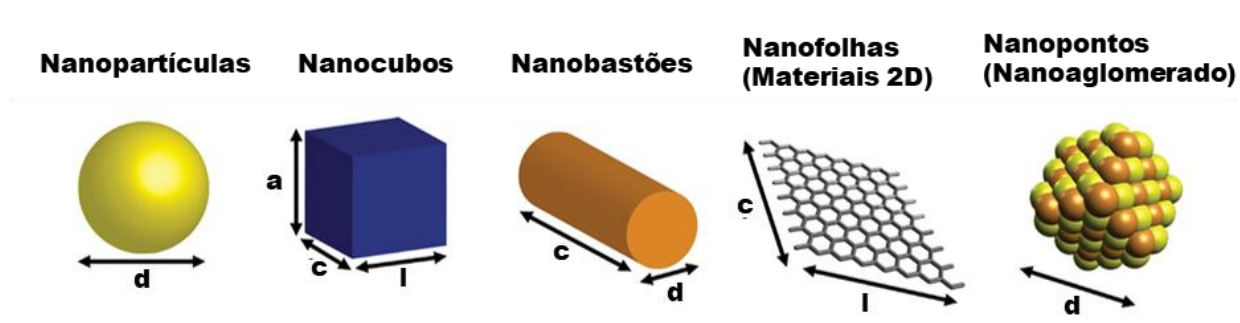
A magnetita e a maghemita, em especial, são amplamente empregadas em contextos biomédicos devido ao comportamento superparamagnético que exibem, à facilidade no controle do tamanho de partícula, à elevada estabilidade coloidal e área superficial específica, além de apresentarem baixa toxicidade (Hu *et al.*, 2018; Ten Hove *et al.*, 2024). Esses atributos conferem-lhes vantagens importantes frente às nanopartículas baseadas em níquel e cobalto (Villa *et al.*, 2016; Wu *et al.*, 2020).

O superparamagnetismo — propriedade característica de nanopartículas de domínio magnético único — é particularmente relevante para a eficácia funcional das IONPs em sistemas biológicos. Essa propriedade, que surge em razão das dimensões reduzidas das partículas, fundamenta sua classificação como nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) (Nedyalkova *et al.*, 2017).

2.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO PELO MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO QUÍMICA

As SPIONs podem ser sintetizadas por diferentes métodos, que incluem abordagens físicas, químicas e biológicas, cada uma com características distintas em termos de controle morfológico, reprodutibilidade, custo e escalabilidade. Os métodos físicos, embora simples em termos técnicos, apresentam desafios quanto à reprodutibilidade e ao controle preciso da morfologia e do diâmetro das nanopartículas. Por outro lado, os métodos químicos são amplamente empregados devido à sua eficiência, simplicidade operacional e flexibilidade, permitindo a obtenção de nanopartículas com diversas formas, como esferas, bastonetes, plaquetas, nanotubos e estruturas porosas ou não porosas., como apresentado na Figura 3

Figura 3 - Morfologias de partículas.



Fonte: Adaptado de Jabbar, Barzinjy e Hamad (2022).

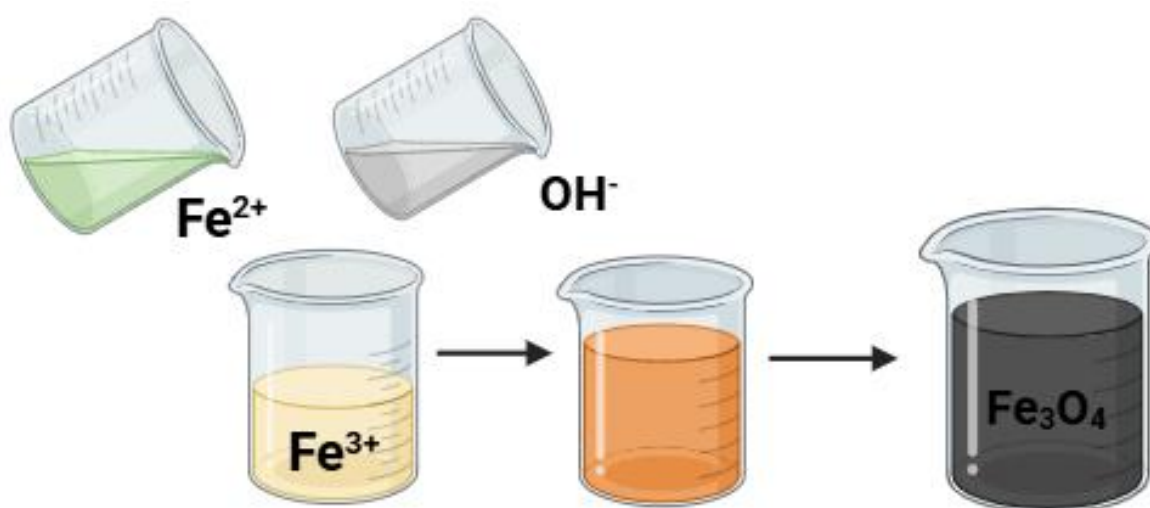
A morfologia final das nanopartículas é fortemente influenciada pelas condições reacionais, como a natureza dos precursores, a temperatura e o pH do processo. Já os métodos biológicos, que utilizam microrganismos, extratos vegetais ou enzimas, destacam-se pela alta reprodutibilidade, bom rendimento e custos

operacionais reduzidos, embora apresentem maior complexidade experimental e demandem maior tempo de processamento (Crețu *et al.*, 2021; Mokhosi *et al.*, 2022).

Dentre as diversas rotas de sínteses, a coprecipitação se destaca por ser uma das abordagens mais simples e eficientes para a síntese de SPIONs. Essa técnica permite a obtenção de nanopartículas funcionalizadas com grupos hidroxila (-OH) em sua superfície, característica fundamental para aplicações biomédicas, incluindo o tratamento do câncer. A presença desses grupos promove hidrofilicidade, biocompatibilidade e estabilidade coloidal, além de fornecer pontos reativos para a ligação de moléculas bioativas, favorecendo estratégias de entrega direcionada e reduzindo a toxicidade (Diez-Pascual; Rahdar, 2022; Sanità; Carrese; Lamberti, 2020).

A coprecipitação (reação apresentada abaixo) baseia-se na reação entre sais férricos e ferrosos, na proporção molar de 2:1, com a adição de um agente precipitante, como hidróxido de amônio ou outros hidróxidos alcalinos ou carbonato de cálcio, sob condições de temperatura controlada, como exemplificado no esquema da Figura 4.

Figura 4 - Esquema da reação de formação de Fe_3O_4

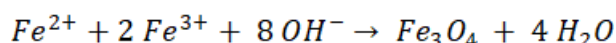


Fonte: Elaborado pela Autora.

Para evitar a oxidação da magnetita (Fe_3O_4) à maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) durante o processo, a síntese deve ser realizada em uma atmosfera inerte, utilizando gases como argônio ou nitrogênio (Hedayatnasab *et al.*, 2020; Sachdeva *et al.*, 2022;

Shabatina *et al.*, 2020). Entre as principais vantagens da coprecipitação, destacam-se o alto rendimento, a escalabilidade e a possibilidade de controle parcial sobre as características estruturais das nanopartículas. Aspectos como o tamanho, a morfologia e a composição das SPIONs são influenciados principalmente pela natureza dos precursores, o pH do meio reacional, a temperatura e a força iônica do meio (Sachdeva *et al.*, 2022; Vangijzegem *et al.*, 2023).

Equação 1: Reação de formação de Fe₃O₄



2.4 ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

As SPIONs destacam-se como sistemas promissores em diversas aplicações biomédicas, com destaque para diagnóstico por imagem, entrega dirigida de fármacos e terapia magnética. Contudo, a viabilidade dessas aplicações, especialmente em ambientes fisiológicos complexos e estudos *in vivo*, depende fortemente da estabilidade físico-química das nanopartículas ao longo do tempo. A manutenção da estabilidade coloidal e das propriedades superparamagnéticas é crucial, pois alterações nessas características podem comprometer não apenas a eficácia funcional, mas também a segurança das SPIONs em contextos clínicos (Friedrich, 2023).

No contexto terapêutico, a hipertermia magnética é uma das aplicações mais relevantes dessas nanopartículas. Essa técnica utiliza SPIONs expostas a um campo magnético alternado para gerar calor localizado nos tecidos tumorais, elevando a temperatura entre 41° e 45 °C. Esse aumento de temperatura pode induzir a morte celular, preferencialmente por apoptose, com mínima lesão aos tecidos saudáveis devido à maior sensibilidade térmica das células cancerígenas. Além disso, a vascularização anômala dos tumores favorece a retenção das nanopartículas, potencializando a eficácia do tratamento. Diferentemente de terapias fotoativadas, como a terapia fotodinâmica, que dependem de reações fotoquímicas para gerar espécies reativas de oxigênio, a hipertermia magnética baseia-se no

dano térmico controlado, o que a torna uma alternativa ou complemento relevante em protocolos oncológicos (Santos, 2023).

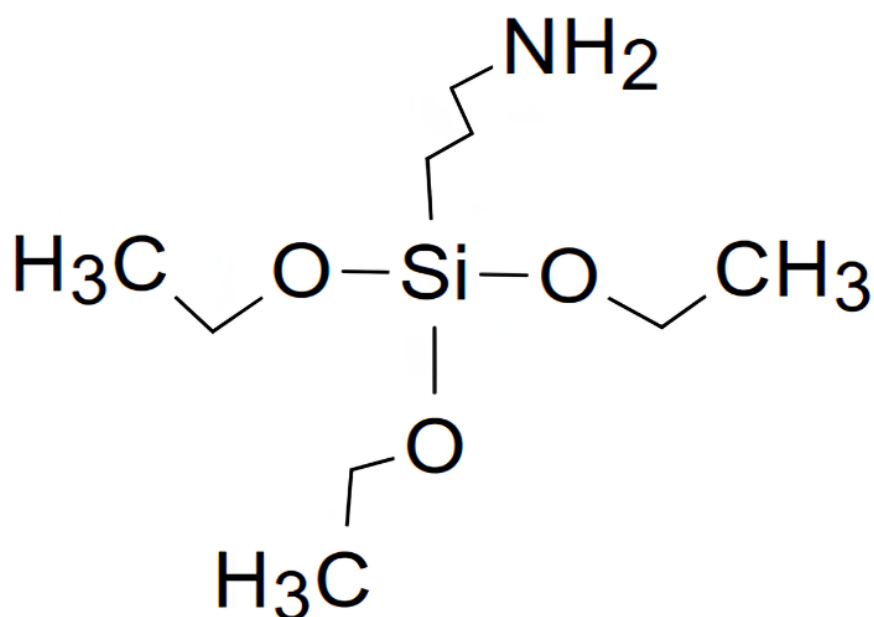
Entre os métodos de sínteses, a coprecipitação destaca-se como uma abordagem amplamente utilizada, devido à sua simplicidade operacional, baixo custo e reduzido impacto ambiental. No entanto, essa abordagem frequentemente resulta na formação de nanopartículas com ampla distribuição de tamanhos e elevada tendência à aglomeração, reflexo direto da alta razão área superficial/volume, forte magnetização e das intensas interações intermoleculares, como forças de Van der Waals e interações dipolo por cargas (Pawlik *et al.*, 2022). Esse comportamento favorece a formação de aglomerados magneticamente estáveis, que perdem o caráter superparamagnético, propriedade essencial para que as nanopartículas não retenham magnetismo residual após a remoção do campo externo — condição indesejável que favorece a sedimentação, reduz a estabilidade coloidal, eleva a toxicidade e inviabiliza seu uso em sistemas biológicos (Aboushoushah *et al.*, 2021).

A tendência natural das SPIONs à agregação e oxidação está relacionada à sua alta energia superficial e instabilidade termodinâmica, tornando indispensável a adoção de estratégias eficazes de estabilização (Hu *et al.*, 2018). Neste contexto, a modificação superficial das SPIONs configura-se como etapa essencial para garantir não apenas estabilidade estrutural, mas também a biocompatibilidade e a funcionalidade desejadas. Diversos tipos de revestimentos têm sido utilizados com êxito para essa finalidade, incluindo surfactantes aniônicos, polímeros biocompatíveis e materiais inorgânicos como sílica, ouro e gadolínio, os quais auxiliam na prevenção da oxidação e da aglomeração, além de promoverem maior dispersão coloidal e prolongada circulação sistêmica (Crețu *et al.*, 2021).

Dentre as abordagens de modificação superficial, destaca-se o uso de agentes funcionalizantes que promovem maior controle sobre a interação das nanopartículas com o meio biológico. Um exemplo amplamente explorado é o 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES), um silano funcional que atua como agente de acoplamento entre a superfície inorgânica das SPIONs e grupos funcionais externos (Figura 5). A reação de silanização mediada pelo APTES permite a introdução de grupos amino na superfície das nanopartículas, os quais não apenas favorecem a dispersão coloidal, mas também viabilizam a conjugação com biomoléculas, como

proteínas, anticorpos ou peptídeos específicos. A figura 6 apresenta a funcionalização com APTES, que contribui para o aumento da estabilidade em meio aquoso e facilita a internalização celular, além de expandir as possibilidades de aplicação das SPIONs em estratégias de separação celular, liberação dirigida de fármacos e diagnóstico molecular (Santos, 2023; Mai; Hilt, 2019; Tsave *et al.*, 2024).

Figura 5 - Estrutura molecular do APTES.

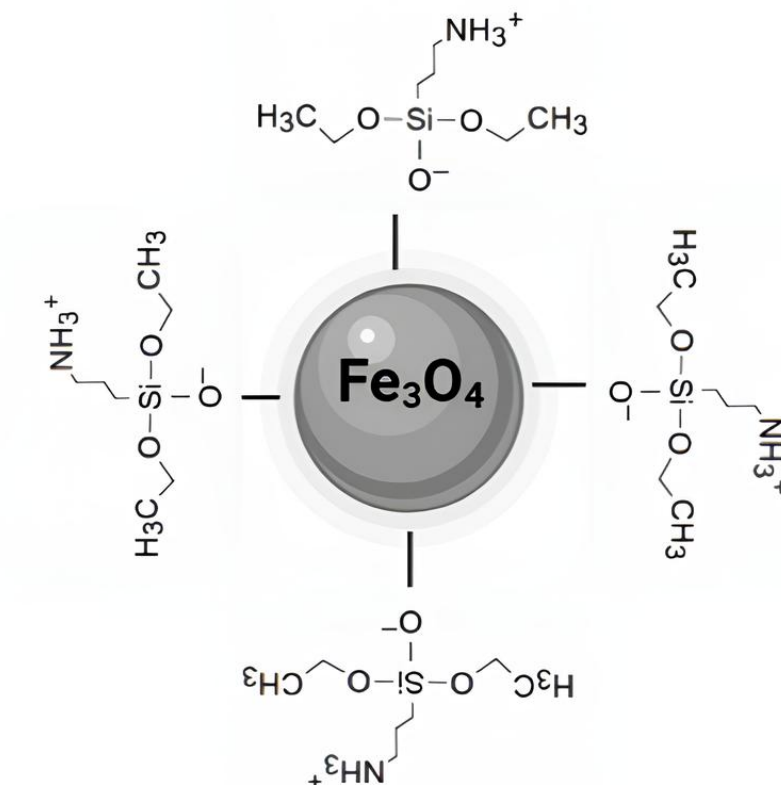


Fonte: Elaborado pela Autora.

Segundo a teoria Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO), o comportamento coloidal é regido pelo balanço entre forças atrativas e repulsivas, o que reforça a importância de um revestimento adequado para evitar a agregação espontânea das nanopartículas em meios biológicos (Vangijzegem *et al.*, 2023). Além disso, o comportamento superparamagnético, resultante da presença de um único domínio magnético por nanopartículas, é fundamental para que as SPIONs respondam apenas na presença de um campo magnético externo, sem apresentarem magnetização remanescente (Nedyalkova *et al.*, 2017). A preservação dessa propriedade está diretamente associada à estabilidade coloidal e estrutural, reiterando a necessidade de uma modulação criteriosa tanto das condições de

síntese quanto das estratégias de funcionalização superficial, visando a segurança e a eficácia das SPIONs em aplicações biomédicas.

Figura 6 - Representação da modificação química das SPIONs com APTES



Fonte: Elaborado pela Autora.

2.5 CÂNCER CEREBRAL

O câncer ocorre quando células saudáveis sofrem mutações em seu DNA e passam a se multiplicar de forma descontrolada, formando tumores. Esses tumores podem ser benignos, quando permanecem localizados, ou malignos, quando têm capacidade de invadir outros tecidos e órgãos, causando metástases. Os tumores malignos costumam ter características específicas, como ambiente ácido, falta de oxigênio (hipóxia), vasos sanguíneos desorganizados e alta pressão no fluido intersticial, o que favorece seu crescimento e dificulta o tratamento (Manescu *et al.*, 2024).

Entre os vários tipos de câncer, os tumores do sistema nervoso central (SNC) são menos comuns, mas extremamente complexos. No Brasil, são esperados cerca de 11.490 novos casos por ano entre 2023 e 2025, com uma distribuição relativamente equilibrada entre homens e mulheres. Em 2020, esses tumores causaram 9.355 mortes no país (Instituto Nacional de Câncer, 2022a). Apesar de sua menor incidência, eles apresentam alta mortalidade e podem causar sérios prejuízos neurológicos.

A origem dos tumores do SNC ainda não é totalmente conhecida. Fatores hereditários e genéticos estão envolvidos, mas a radiação ionizante é o fator de risco mais bem comprovado. A diversidade de tipos tumorais e a baixa frequência desses casos dificultam o entendimento completo de suas causas (Instituto Nacional de Câncer, 2022b).

Entre os tumores cerebrais, o glioblastoma multiforme (GBM) é o mais agressivo e letal. Ele se origina de astrócitos, células que dão suporte aos neurônios, e corresponde a cerca de 40% a 50% dos tumores malignos do cérebro. O GBM tem crescimento rápido e infiltrativo, dificultando a remoção completa por cirurgia. Além disso, apresenta grande resistência à radioterapia e à quimioterapia (Yu *et al.*, 2022).

O tratamento padrão para o GBM envolve cirurgia, seguida de radioterapia e quimioterapia com temozolomida. Em alguns casos, também se utiliza um dispositivo que emite campos elétricos para dificultar a divisão das células tumorais. No entanto, mesmo com essas abordagens, a sobrevida média dos pacientes é de apenas 12 a 15 meses, e menos de 10% sobrevivem por cinco anos após o diagnóstico. Recorrências são muito comuns e ocorrem em até 90% dos casos, geralmente próximas ao local da lesão inicial (Instituto Nacional de Câncer, 2022A; Pouyan *et al.*, 2025).

Diante desse cenário, é urgente o desenvolvimento de novas estratégias de tratamento mais eficazes e direcionadas. Investimentos em pesquisas que explorem os mecanismos moleculares do tumor e em novas tecnologias terapêuticas são fundamentais para melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes com glioblastoma.

2.6 TERAPIA FOTODINÂMICA

A fototerapia representa uma abordagem terapêutica minimamente invasiva que utiliza a luz como ferramenta para ativar agentes fotoativos em tratamentos médicos, especialmente no combate ao câncer. Essa técnica baseia-se no uso de substâncias capazes de responder à luz, como fotossensibilizadores ou agentes fototérmicos, que, uma vez ativados por fontes luminosas específicas, como LEDs ou luz infravermelha próxima (NIR), desencadeiam reações localizadas capazes de destruir células tumorais com mínima agressão aos tecidos saudáveis (Molkenova *et al.*, 2022).

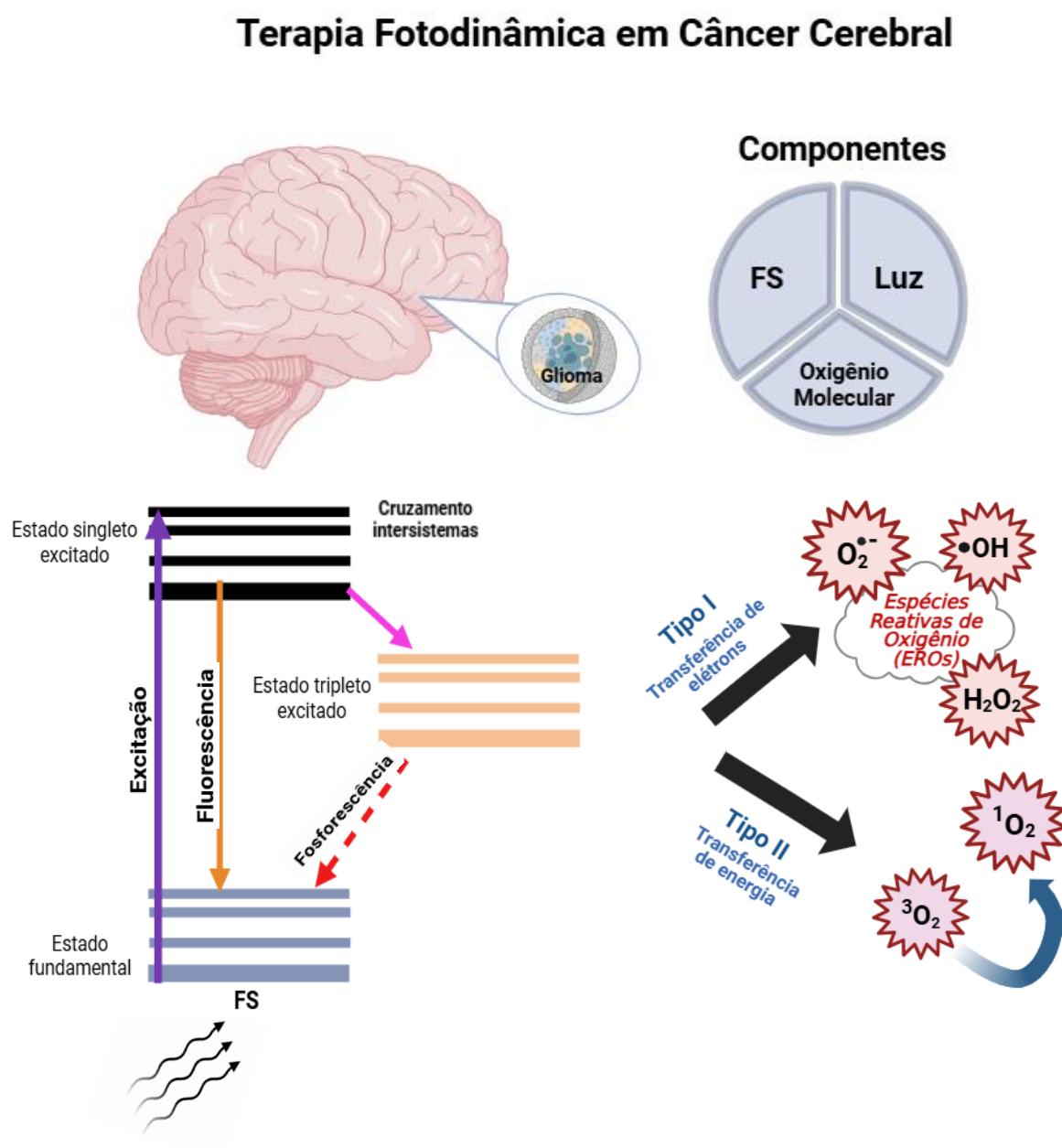
Entre as modalidades de fototerapia, destaca-se a terapia fotodinâmica (TFD), caracterizada por sua elevada seletividade e baixa toxicidade sistêmica. A TFD combina três componentes essenciais: um fotossensibilizador (FS), uma fonte de luz e a disponibilidade de oxigênio molecular no tecido. A ativação do FS por luz de comprimento de onda apropriado promove a transferência de energia para o oxigênio, gerando espécies reativas de oxigênio (EROs), que induzem danos celulares irreversíveis, levando à morte celular, destruição da vasculatura tumoral e ativação de respostas imunológicas locais (Zhou *et al.*, 2023).

O mecanismo da terapia fotodinâmica segue uma sequência bem definida, é ilustrado na Figura 7: o FS absorve a energia luminosa e transita do estado fundamental (S_0) para o estado excitado singlete (S_1). Esse estado pode decair emitindo fluorescência ou sofrer cruzamento intersistemas para o estado tripleto (T_1), mais duradouro e reativo. A partir daí, podem ocorrer dois caminhos principais: no mecanismo Tipo I, há transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio, gerando radicais livres e EROs como superóxido e peróxido de hidrogênio; no mecanismo Tipo II, a energia é transferida diretamente ao oxigênio molecular, produzindo oxigênio singlete (1O_2), altamente oxidante. Ambos os processos culminam em estresse oxidativo intenso, capaz de induzir apoptose, necrose ou autofagia, além de comprometer a vascularização tumoral e estimular o sistema imune (Kwiatkowski *et al.*, 2018; Domka *et al.*, 2023).

A eficácia da TFD está diretamente relacionada ao comprimento de onda utilizado, que deve coincidir com o pico de absorção do FS e garantir penetração adequada nos tecidos. Agentes fotossensibilizadores podem ser ativados por luz

visível (400–700 nm) ou na região do NIR (700–900nm), sendo esta preferida em aplicações clínicas devido à sua maior capacidade de penetração tecidual. Diversas fontes de luz, como lasers de alexandrita, lasers de corante e lasers de diodo, são utilizadas de acordo com as características ópticas do agente empregado (Gan *et al.*, 2023).

Figura 7 - Representação do mecanismo da TFD em câncer cerebral



Fonte: Elaborado pela Autora.

Historicamente, os FS evoluíram em três gerações. Os de primeira geração, como a hematoporfirina e seus derivados (Photofrin®), apresentavam baixa pureza, absorção restrita no comprimento de onda ~630 nm e longa permanência no organismo, aumentando o risco de fototoxicidade (Domka *et al.*, 2023). Os de segunda geração, como clorinas, ftalocianinas e o pró-fármaco 5-ALA, mostraram maior pureza, absorção em comprimentos de onda mais longos e eliminação mais rápida, mas ainda apresentavam limitações de solubilidade e seletividade. Os de terceira geração associam moléculas fotoativas a sistemas de direcionamento, como anticorpos, peptídeos ou nanocarreadores, aumentando a seletividade tumoral e reduzindo danos a tecidos saudáveis (Correia *et al.*, 2021).

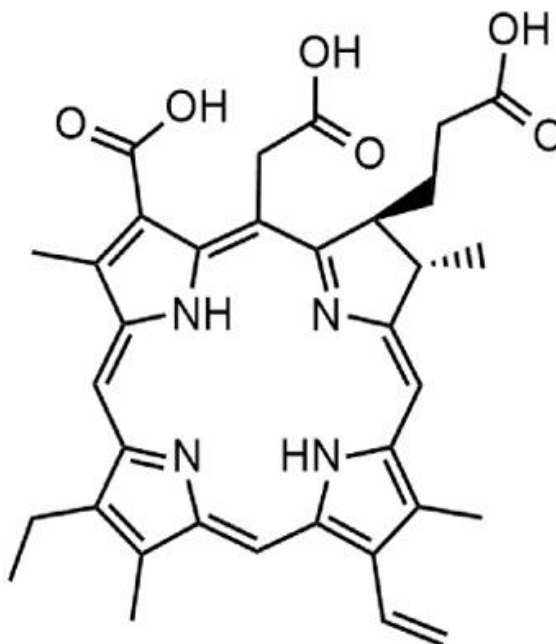
Uma das principais vantagens da TFD é que, para a maioria dos FS, a ação citotóxica ocorre apenas na presença de luz, reduzindo a toxicidade fora do local irradiado (Oluwajembola *et al.*, 2024). No entanto, nem todos os FS permanecem totalmente inativos no escuro: alguns derivados de porfirinas ou ftalocianinas não otimizadas, bem como compostos organocalcogênicos, podem apresentar toxicidade intrínseca mesmo sem luz, seja por auto-oxidação, produção espontânea de EROs ou interações inespecíficas com membranas celulares (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

Avanços recentes na síntese de novos FS e no uso de nanomateriais como sistemas carreadores têm ampliado o potencial terapêutico da TFD, garantindo maior seletividade, controle da farmacocinética e eficiência na geração de EROs. Tais inovações consolidam a TFD como uma estratégia promissora na terapia do câncer, com potencial para aplicações mais amplas na prática clínica (Amirshaghghi *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2024).

2.7 CLORINA E6

A Ce6 é um fotossensibilizador de segunda geração (estrutura química apresentada pela Figura 8) com grande potencial para aplicação em TFD. Em comparação aos compostos da primeira geração, como os derivados de hematoporfirina, a Ce6 apresenta vantagens importantes. Entre elas estão a maior eficácia na destruição de células tumorais, menor toxicidade na ausência de luz e rápida eliminação do corpo, o que ajuda a reduzir os efeitos colaterais do tratamento.

Figura 8 - Estrutura molecular da Clorina E6.



Fonte: Adaptado de Hak *et al.* (2023).

Uma das características mais relevantes da Ce6 é sua capacidade de fluorescência quando excitada por luz na faixa de 660 a 670 nm. Esse comprimento de onda permite uma penetração mais profunda da luz nos tecidos humanos, o que melhora a eficácia terapêutica e permite também o uso da Ce6 como agente de imagem fluorescente (Amirshaghghi *et al.*, 2019; Domka *et al.*, 2023).

Apesar dessas qualidades, a aplicação clínica da Ce6 ainda apresenta desafios. O principal problema é sua baixa solubilidade em água, o que favorece a agregação das moléculas em meio fisiológico. Essa agregação dificulta sua distribuição adequada no organismo e reduz a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que são essenciais para o efeito fotodinâmico (Hak *et al.*, 2023).

Para superar essas limitações, têm-se desenvolvido diferentes sistemas de liberação de fármacos, como nanocarreadores e plataformas de liberação controlada. Esses sistemas buscam melhorar a estabilidade da Ce6, aumentar sua solubilidade e direcionar de forma mais eficaz o FS para os tumores. No entanto, muitos desses métodos ainda enfrentam dificuldades, como baixa reprodutibilidade e perda de eficiência terapêutica após a modificação da molécula. Assim, novos

estudos continuam sendo realizados para desenvolver formulações da Ce6 que sejam estáveis, eficientes e clinicamente viáveis. Com esses avanços, espera-se ampliar o uso da Ce6 na TFD e melhorar os resultados no tratamento de diferentes tipos de câncer (Domka *et al.*, 2023).

2.8 NANOSSONDAS

Nanossondas são nanoestruturas multifuncionais desenvolvidas para atuar de forma precisa no diagnóstico e, principalmente, no tratamento do câncer. Elas podem ser produzidas a partir de diferentes nanomateriais, como nanopartículas de ouro, óxido de ferro, pontos quânticos, lipossomas e polímeros biodegradáveis. Essas estruturas podem ser funcionalizadas com moléculas direcionadoras, como anticorpos e peptídeos, capazes de reconhecer marcadores tumorais específicos (Carrese; Sanita; Lamberti, 2022). Essa característica aumenta a seletividade para células cancerígenas, reduzindo danos aos tecidos saudáveis e minimizando efeitos colaterais.

Algumas formulações são projetadas para carregar simultaneamente mais de um tipo de composto ativo. Um exemplo é a incorporação, em uma mesma nanopartícula, de um fotossensibilizador (FS) e de uma biomolécula direcionadora. Essa combinação permite, ao mesmo tempo, o reconhecimento específico de células tumorais e a ativação terapêutica pela luz, como na terapia fotodinâmica (TFD). Essa abordagem potencializa a eficácia do tratamento, reduzindo a exposição de tecidos não afetados e possibilitando estratégias de ação mais precisas (Cândido *et al.*, 2022; Vieira *et al.*, 2022).

No tratamento oncológico, as nanossondas podem transportar diferentes agentes, como quimioterápicos, fotossensibilizadores ou moléculas para terapia gênica, liberando-os de forma controlada no local do tumor. Essa liberação pode ser desencadeada por condições específicas do microambiente tumoral, como meio ácido, presença de enzimas ou estímulos externos, como luz e calor (Azimizonuzi *et al.*, 2025). Assim, é possível aumentar a eficácia terapêutica e reduzir a toxicidade sistêmica.

Entre os avanços recentes, destacam-se nanossondas que operam na faixa do infravermelho próximo (NIR), capazes de penetrar profundamente nos tecidos,

permitindo tratamentos mais eficientes para tumores sólidos. Um exemplo é o uso de pontos quânticos modificados com catalase e peptídeo RGD, que, além de liberarem agentes terapêuticos, aliviam a hipóxia tumoral e estimulam a resposta imune, resultando em maior destruição das células malignas e aumento da sobrevida em modelos pré-clínicos (Zhou *et al.*, 2021).

Outro recurso promissor são as nanossondas magnéticas, que podem ser direcionadas por campos magnéticos externos para concentrar o tratamento na região tumoral. Associadas a agentes terapêuticos, permitem controlar a distribuição do medicamento e, em alguns casos, gerar calor local para destruir células cancerígenas por hipertermia (Jiao *et al.*, 2022).

Apesar dos avanços, ainda existem desafios a serem superados, como a necessidade de garantir biocompatibilidade elevada, estabilidade no organismo e produção em larga escala com reprodutibilidade. Questões relacionadas à heterogeneidade tumoral e à resposta individual dos pacientes também representam barreiras para sua aplicação clínica mais ampla. Mesmo assim, essas tecnologias figuram entre as estratégias mais promissoras para tornar os tratamentos contra o câncer mais seletivos, seguros e eficazes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As SPIONs foram primeiramente sintetizadas pelo método de coprecipitação química, posteriormente revestidas com um agente de acoplamento silano e funcionalizadas com a Ce6 para a formação de nanossondas. Essas soluções coloidais foram então caracterizadas por análise de espectroscopia de UV-visível para determinação das concentrações de ferro, por DLS e Potencial Zeta para determinação do diâmetro hidrodinâmico e da estabilidade, por FT-IR para confirmação da presença de grupos funcionais e por análise de fluorescência. Após toda a caracterização, as nanopartículas foram estudadas *in vitro* na linhagem celular M059J para análise tempo de incorporação e internalização das nanossondas.

3.1 SÍNTESE DAS SPIONs

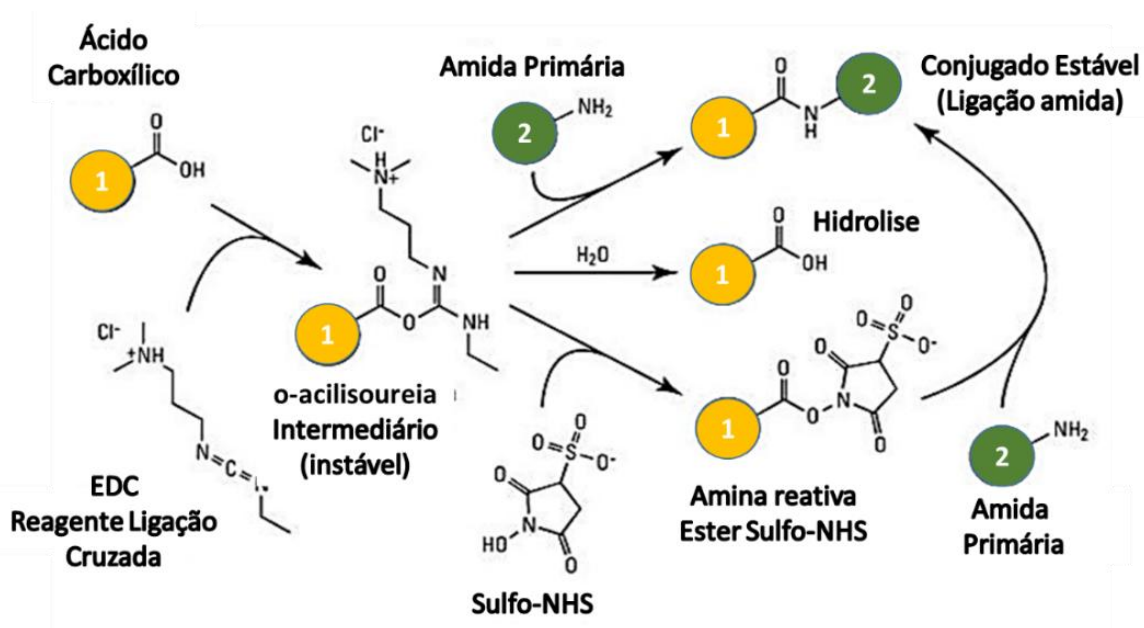
As SPIONs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, assim como descrito por Massart (1981). O protocolo de síntese de Mérida e colaboradores (2015), foi adaptado por meio de uma colaboração entre o Laboratório de Nanossensores e o Rinaldi Research Laboratory da University of Florida. Nesta síntese, soluções de cloreto de ferro II ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) e III ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) respectivamente a $0,2 \text{ mol. L}^{-1}$ e $0,4 \text{ mol. L}^{-1}$, foram individualmente preparadas em 100 mL de água ultrapura previamente desoxigenada com gás nitrogênio por 30 min. Em seguida os sais foram solubilizados através da ultrassonicação em banho e misturados. Uma agitação de 250 rpm, a $85 \text{ }^\circ\text{C}$ e pH da solução entre 8 e 9 foram mantidos durante toda a síntese e a precipitação dos óxidos de ferro ocorreu por meio da adição de 35 mL de hidróxido de amônio (NH_4OH). Após o resfriamento, alíquotas da amostra foram centrifugadas e os sobrenadantes descartados. A estabilização da superfície das SPIONs foi realizada por meio da adição de 3-aminopropiltriétoxissilano (APTES) ($\text{C}_9\text{H}_{23}\text{NO}_3\text{Si}$) a partir de um método adaptado de Ebrahimezhad *et al.* (2015). As SPIONs sintetizadas foram dispersas em uma solução de etanol e água, em seguida o reagente APTES foi gotejado. A solução foi levada ao ultrassom de ponta com alta energia por 60 min sob atmosfera de nitrogênio e, em seguida separadas magneticamente, com descarte do

sobrenadante. Em seguida, foram submetidas a ciclos de purificação com etanol e água, o sobrenadante descartado e ressuspensas novamente em água. Após a estabilização, o pH das SPIONs@APTES foi ajustado para um meio ácido.

3.2 SÍNTESE DA NANOSSONDA E MODIFICAÇÃO QUÍMICA VIA CARBODIIMIDA

As nanossondas foram produzidas utilizando SPIONs@APTES previamente sintetizadas, as quais foram funcionalizadas ao fotossensibilizador Ce6. A molécula da Ce6 possui três grupos carboxílicos que por meio da ligação amida foram ligados ao terminal amino (-NH₂) das nanopartículas. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, Sigma Aldrich, 22980) favorece a ligação dos grupos carboxílicos com o sulfo-NHS (N hydroxysulfosuccinimide, Thermo Scientific, 24510), formando um éster mais estável que o o-ácilissoureia, o que permite uma conjugação mais eficiente e uma ligação amida estável, como exemplificado na Figura 9. A razão molar dos reagentes foram: 1 Ce6 (8,4 mM): 25 Sulfo NHS (187,5 mM): 10 EDC (83,5 mM) (Castilho; Hewitt; Raniero, 2017).

Figura 9 - Representação da reação de formação da amida.



Fonte: Sigma Aldrich, 2024.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

3.3.1 Análise de Espectroscopia de UV-visível

As amostras de SPIONs@APTES foram caracterizadas pela técnica de Espectroscopia de UV-Visível em um espectrofotômetro DeNovix DS-11, na região de 190-840 nm com resolução espectral de 1 nm. Os espectros foram adquiridos pela transmissão da luz por meio de uma gota de amostra pipetada entre as superfícies superior e inferior com caminho óptico auto-ajustável entre 0,02 - 0,5 mm, sendo a superfície de pipetagem das amostras composta por aço inoxidável e a janela de safira (inferior) e fibra de quartzo (superior). Em todas as leituras, 2 μ L das amostras foram medidos e os resultados plotados com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1. A concentração de ferro presente nas SPIONs@APTES foi determinada mediante a ensaios de o-fenantrolina, com resultados também obtidos por Espectroscopia de UV-visível.

3.3.2 Análise de DLS

A análise de DLS determinou o diâmetro hidrodinâmico das soluções coloidais, por meio do equipamento ZetaSizer nano – ZS90 da Malvern, sendo o índice de refração utilizado para as SPIONs@APTES igual a 1,450. No equipamento foi definido o tempo de equilíbrio de 120 s, com temperatura de 25°C. Um volume de 500 μ L de nanopartícula foi adicionado à cubeta de poliestireno (modelo ZEN0118, Sarstedt), para verificar a distribuição de tamanho das partículas, no modo “Size”, o ângulo de medida utilizado foi de 90°, sendo realizado 3 medidas, com um número de corrida igual a 10 e tempo de duração de 30 s. Foi realizada uma média e com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1, os dados exportados foram plotados.

3.3.3 Análise de Potencial Zeta

A análise do Potencial Zeta determinou a estabilidade e a carga superficial das soluções coloidais, no modo “Zeta” por meio do mesmo equipamento da análise de DLS, quando um diferencial de potencial elétrico foi aplicado por meio de uma

cubeta com eletrodos de ouro. As soluções coloidais foram adicionadas às cubetas capilares com eletrodos (modelo DTS1070, Malvern) com o auxílio de uma seringa, sem a formação de bolhas de ar. O modelo matemático definido foi de Smoluchowski, uma média de três análises por amostragem foi realizada para a obtenção dos resultados e, com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1, os dados exportados foram plotados.

3.3.4 Análise de FT-IR

Os produtos de síntese das partículas e nanossondas foram caracterizados por meio dos modos vibracionais das ligações químicas. A análise de FT-IR foi realizada em um espectrofotômetro FT-IR por transformada de Fourier da Agilent (modelo Cary 630), equipado com acessório de refletância total atenuada com pedestal de aço inox e cristal de diamante, localizado no Laboratório de Nanossensores (LNS) (IP&D/UNIVAP). Os espectros foram obtidos na faixa espectral de 4000-450 cm^{-1} , com resolução espectral de 4 cm^{-1} , sendo a média de 64 varreduras/ponto. O background foi feito com o cristal limpo em atmosfera ambiente. As SPIONs foram pipetadas e secas no pedestal do equipamento para melhor obtenção das absorções nos espectros.

3.3.5 Análise de pH

A análise do pH do meio foi realizada no titulador da Metrohm (modelo 848 Titrino Plus), para corroborar com a análise de estabilidade das SPIONs@APTES utilizando a curva dos valores do Potencial Zeta e Diâmetro Hidrodinâmico em função do pH do meio.

3.3.6 Quantificação de Ferro

A concentração de ferro presente nas SPIONs foi determinada por meio da espectroscopia UV-visível, com protocolo desenvolvido no Rinaldi Research Laboratory da University of Florida. As SPIONs estabilizadas com APTES foram digeridas em ácido nítrico (HNO_3) a 70% em banho seco a 101°C por

aproximadamente 12 horas. Posteriormente, a amostra digerida foi evaporada a 115°C, seguido da adição de água deionizada. Para a redução dos íons Fe³⁺ a Fe²⁺, adicionou-se cloridrato de hidroxilamina (NH₂OH. HCl).

Após a redução, acetato de sódio (NaO₂CCH₃) foi adicionado como agente tamponante e adicionou-se a 1,10-fenantrolina monohidratada (C₁₂H₈N₂. H₂O), agente responsável pela formação do complexo Fe (II) - ortofenantrolina que apresenta absorvância máxima em 508 nm. Uma curva de calibração foi preparada a partir de concentrações de ferro conhecidas e por meio de regressão linear foi determinada a concentração das amostras (Mérida *et al.*, 2015; Unni *et al.*, 2017).

3.3.7 Análise de Fluorescência

A emissão da fluorescência das nanossondas foi realizada para caracterizar a presença da Ce6. A análise foi caracterizada por um leitor de microplaca modelo VANTastar da marca BMG Labtech, com monocromadores de filtro variável linear de excitação e emissão. Nos parâmetros do monocromador foi utilizado uma excitação em 388-412 nm e uma faixa de 425 nm até 740 nm com resolução de 1 nm para o espectro de emissão de fluorescência. Para a medição o volume de 200 µL de amostra foi adicionado a uma placa de 96 poços, o ganho da fotomultiplicadora foi de 1000 com 200 varreduras por análise.

3.4 CULTURA CELULAR DA LINHAGEM M059J

A linhagem celular de glioblastoma maligno, M059J, proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foi cultivada em garrafas estéreis de polipropileno de 25 cm² com meio de cultura DMEM/F-12 HAM (Sigma Life Science, D8900), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Life Technologies, 16000-044) e 0,05 mM de aminoácidos não-essenciais. A cultura celular foi mantida em estufa de crescimento a 37°C em uma atmosfera de 95% (ThermoFisher Scientific, series 8000 Water-Jacketed CO₂ Incubator). O meio foi substituído a cada dois dias e as células subcultivadas a cada 15 dias. Todos os experimentos com essa linhagem foram realizados em triplicata.

3.5 ANÁLISE DO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO DAS NANOSSONDAS

A análise do tempo de internalização foi realizada para determinar a intensidade de emissão das nanossondas que permaneceram internalizadas na célula tumoral por meio do leitor de microplaca modelo VANTASTAR da marca BMG Labtech. A linhagem utilizada foi a M059J. O protocolo de análise utilizado foi o método de fluorescência, modo pontual (endpoint) no comprimento de onda de 660 nm, ótica bottom, no qual o feixe incidente é abaixo da amostra e com ganho da fotomultiplicadora de 1000. Para a análise, as células foram plaqueadas com uma densidade de 1×10^5 células/mL em uma placa de 96 poços. Após 24h de adesão, foi adicionada ao meio de cultura, as nanossondas com concentração final de 2,7 $\mu\text{g/mL}$ da Ce6 e tempos de incubação de 60, 90, 120, 180, 240 e 300 minutos. Decorridos os períodos de incorporação, as células foram lavadas com 150 μL de solução de tampão fosfato-salino (PBS 1x, pH 7.4) e foi realizada a leitura. Para a realização da estatística e plotagem dos gráficos foi utilizado o programa OriginPro versão 8.5.1.

3.6 ENSAIO DE TERAPIA FOTODINÂMICA EM CULTURA CELULAR

Para o ensaio de TFD, a suspensão de 1×10^5 células/mL (M059J) foi aplicada em placas de 96 poços contendo meio de cultura completo. Após 24 h de adesão celular, o meio foi substituído pelas Nanossondas. As células foram mantidas em contato com a substância por 1 h e 30 minutos, sob condições de cultivo. Decorrido o tempo de incorporação, o meio contendo a substância foi removido, os poços foram lavados com PBS e foi adicionado um novo meio de cultura completo para a irradiação utilizando o LED Irrad-Led5 660 (Biopdi) do Laboratório de Terapia Fotodinâmica (IP&D/UNIVAP), no comprimento de onda de 660 nm, com potência de 36,8 mW, na dose de 36,8 J/cm^2 , sendo a placa posicionada a 1,5 cm de distância da fonte de irradiação.

3.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS NANOSSONDAS

A viabilidade celular da linhagem M059J foi analisada por meio de três abordagens complementares, de forma a assegurar uma avaliação abrangente e confiável. Empregou-se os ensaios colorimétrico com MTT (3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio, Sigma Aldrich, M5655), método de exclusão utilizando o corante Azul de Tripán (3,3'- (3,3'-dimetil[1,1'-bifenil] -4,4'-diyl) bis (azo)] bis [5-amino-4-hidroxynaphthaleno-2,7- disulfonato, Sigma Aldrich, T8154) e o ensaio de Resazurina (7-Hidróxi-3H-fenoxazin-3-ona-10-óxido resazurina, sal sódico, Sigma Aldrich, R7017).

O teste de MTT é um ensaio versátil e reconhecido por sua capacidade quantitativa de mensurar a atividade mitocondrial e é amplamente utilizado em estudos de proliferação e citotoxicidade (Berridge; Herst; Tan, 2005). Este ensaio teve a finalidade de investigar a variação da atividade mitocondrial da linhagem celular após a aplicação das nanossondas. Seu método baseia-se na redução do sal tetrazólio pela ação das enzimas desidrogenases mitocondriais ativas, resultando a formação de cristais de formazan de coloração violeta, sendo a intensidade dessa coloração proporcional ao número de células viáveis. A leitura da absorbância foi realizada a 570 nm, utilizando-se o espectrofotômetro VANTastar da marca BMG. O valor da atividade mitocondrial foi determinado pela Equação 2.

Equação 2: Cálculo da atividade mitocondrial em porcentagem.

$$\textit{Atividade Mitocondrial} (\%) = \left(\frac{\textit{Abs}_{\textit{amostra}} - \textit{Abs}_{\textit{branco}}}{\textit{Abs}_{\textit{controle}} - \textit{Abs}_{\textit{branco}}} \right) \times 100$$

O método de exclusão do corante Azul de Tripán é um ensaio que permite diferenciar células viáveis de não viáveis com base na integridade da membrana plasmática, assim, avaliou a viabilidade celular, com coloração em azul das células inviáveis e translúcidas as células viáveis. Por meio do microscópio invertido NIB-100 (Bel Equipamentos Analíticos) foram obtidas 30 imagens pelo programa Future WinJoe versão 1.0.7.9. A contagem celular foi realizada no programa ImageJ, versão 1.48, e calculadas por meio da Equação 3.

Equação 3: Cálculo da viabilidade celular do método de exclusão com corante Azul de Tripan em porcentagem.

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \left(\frac{Número\ de\ células\ translúcidas}{Número\ total\ de\ células} \right) \times 100$$

Além dos ensaios de MTT e o método de exclusão de Azul de Tripan, também se empregou o ensaio de Resazurina.

Equação 4: Cálculo da viabilidade celular do ensaio de Resazurina em porcentagem.

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \left(\frac{RFU_{amostra} - RFU_{branco}}{RFU_{controle} - RFU_{branco}} \right) \times 100$$

A interpretação dos resultados considerou os critérios estabelecidos pela ISO 10993-5/2009, segundo os quais valores de viabilidade inferiores a 70% indicam potencial citotóxico. Dessa forma, a combinação dessas metodologias possibilitou uma análise robusta do efeito das nanossondas sobre a viabilidade celular, correlacionando alterações na atividade mitocondrial, integridade de membrana e metabolismo global das células da linhagem M059J, sendo todas as análises conduzidas em triplicata para garantir consistência, reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados.

4 RESULTADOS

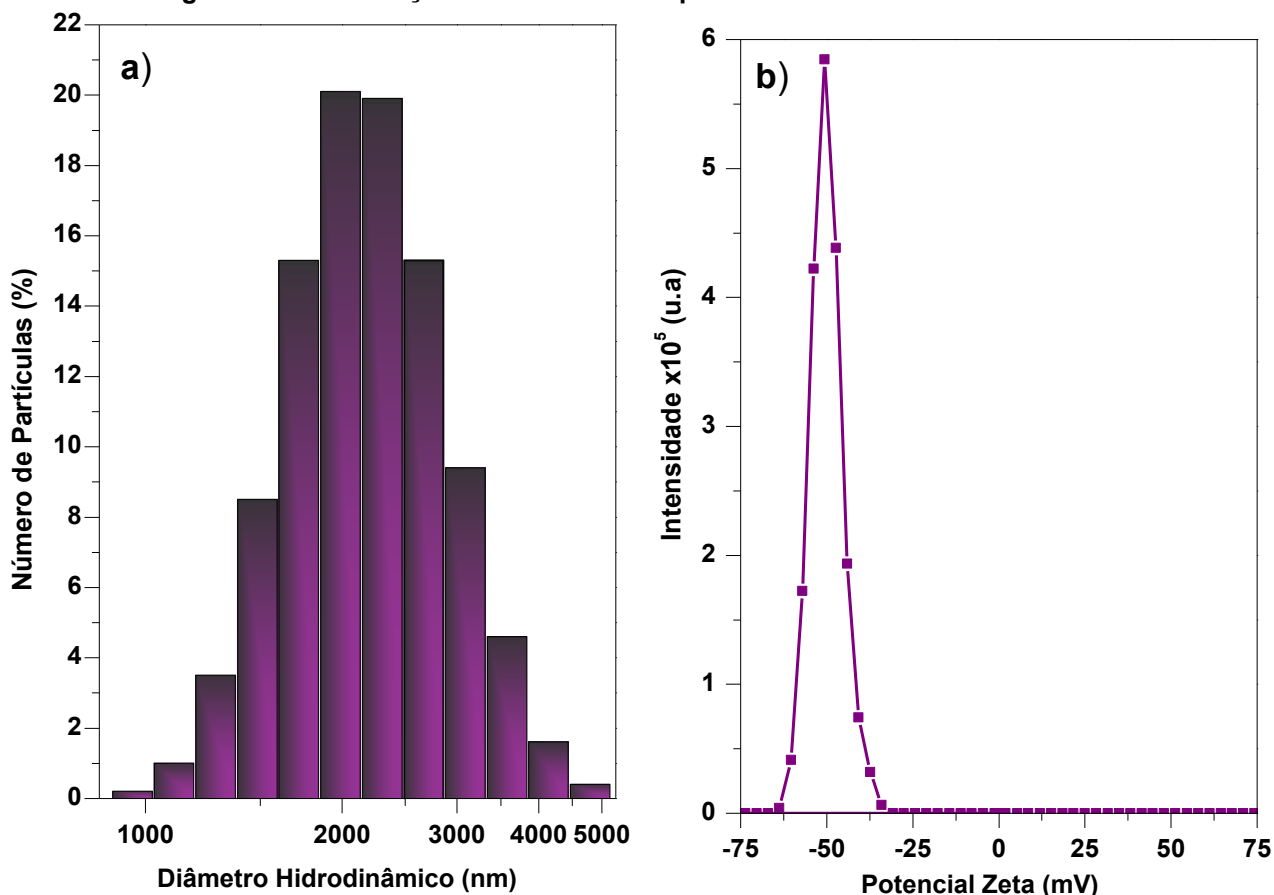
Nesta sessão são apresentados os resultados experimentais obtidos no desenvolvimento desta dissertação, iniciando com a síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs) antes e após estabilização, seguindo pelo processo de funcionalização para formação das Nanossondas e caracterizando-as, finalizando com apresentação da citotoxicidade das nanossondas produzidas.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SPIONS E SPIONS@APTES

Após o processo de síntese, observou-se que a solução de SPIONs tinha coloração preta e apresentava interação com o campo magnético externo aplicado (ímã de Neodímio), fatores que indicam a formação do Fe_3O_4 . A tonalidade escura é típica da magnetita, resultado de sua estrutura cristalina e propriedades eletrônicas, que favorecem forte absorção de luz na região visível. Essa aparência difere da observada em outros óxidos de ferro: a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) apresenta cor marrom-avermelhada a marrom-escura, enquanto a hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) possui coloração vermelho-terrosa característica, ambas determinadas por diferenças na organização cristalina e nos estados de oxidação do ferro.

Na Figura 10 são apresentados os dados de DLS, que indicaram diâmetro hidrodinâmico médio de $2,404 \mu\text{m}$ com índice de polidispersividade (PDI) 0,173 para SPIONs sem estabilizante (Figura 10a), o que demonstra a presença de agregados significativos e uma ampla distribuição de tamanho, além de apresentarem um valor de Potencial Zeta médio de $-17,2 \text{ mV}$ (Figura 10b).

Figura 10 - Distribuição de tamanho e de potencial elétrico das SPIONs

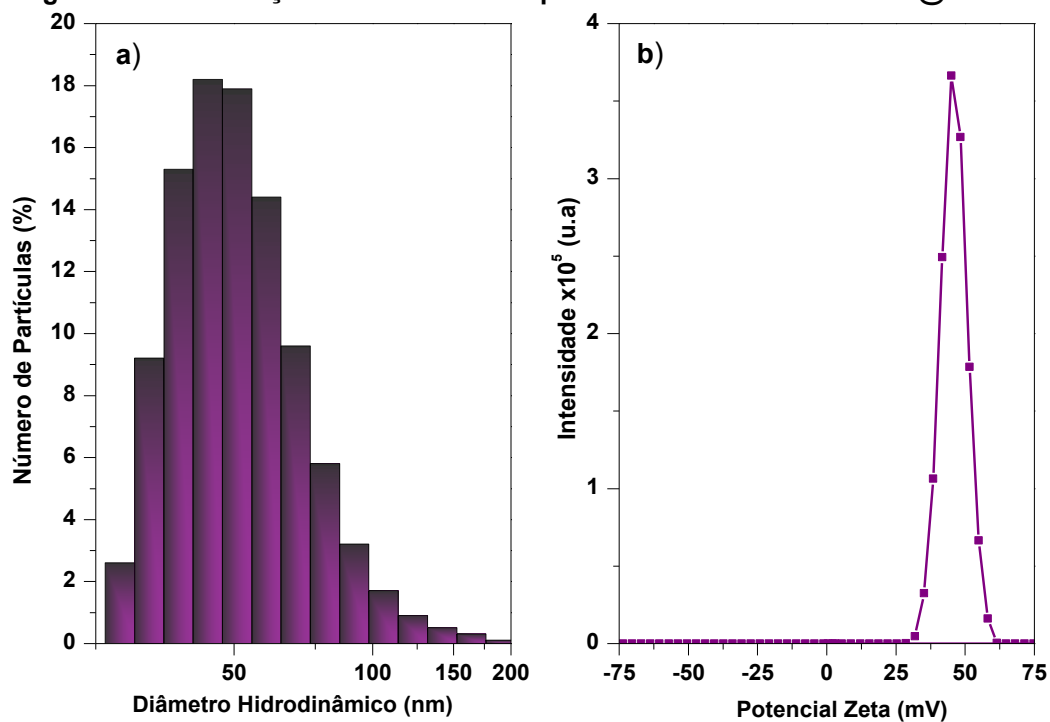


Fonte: Elaborado pela Autora.

Por outro lado, as SPIONs após estabilizadas apresentaram um diâmetro médio de 175,6 nm, um valor de Pdl 0,262 (Figura 11a) e um valor de Potencial Zeta médio de +39,3 mV (Figura 11b), o que confirma que o agente de acoplamento silano APTES melhora a distribuição de tamanho e assim como a sua estabilidade coloidal, visto que antes da estabilização as SPIONs apresentavam um valor na região de instabilidade, compreendida entre -30 mV e +30 mV, onde as forças de repulsão eletrostática são insuficientes para impedir a aglomeração.

A mudança do Potencial Zeta para valor positivo decorre da presença dos grupos amino ($-NH_2$) do APTES na superfície das nanopartículas, que, em meio aquoso levemente ácido ou próximo ao pH fisiológico, sofrem protonação, formando grupos $-NH_3^+$. Essa modificação superficial não apenas altera a carga das partículas, mas também intensifica a repulsão eletrostática entre elas, reduzindo a tendência à agregação e garantindo maior estabilidade da suspensão ao longo do tempo.

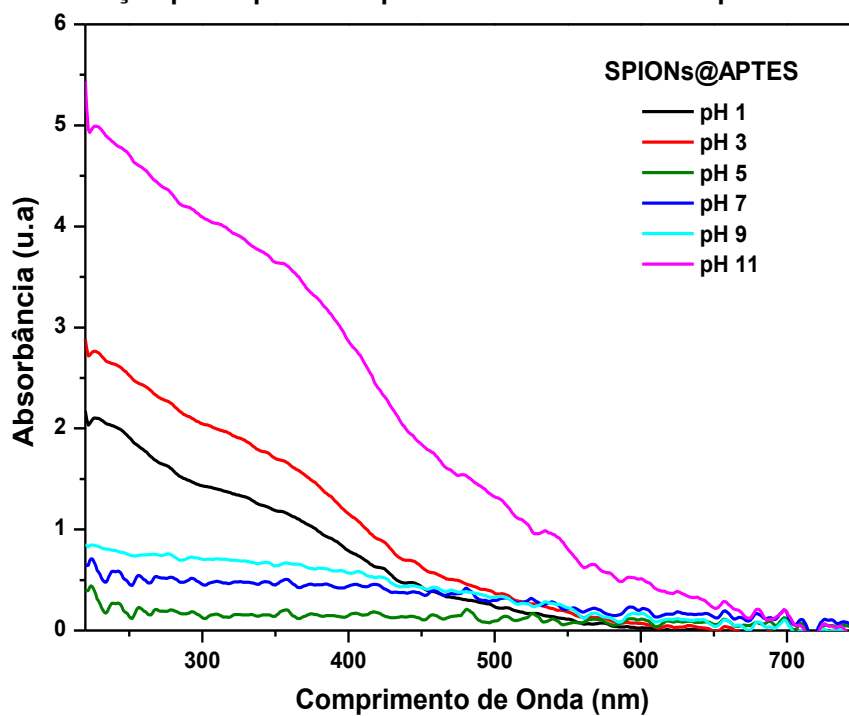
Figura 11 - Distribuição de tamanho e de potencial elétrico das SPIONs@APTES.



Fonte: Elaborado pela Autora.

Na Figura 12 é apresentado o comportamento da curva no UV-visível das SPIONs estáveis quando o valor do pH do meio é alterado.

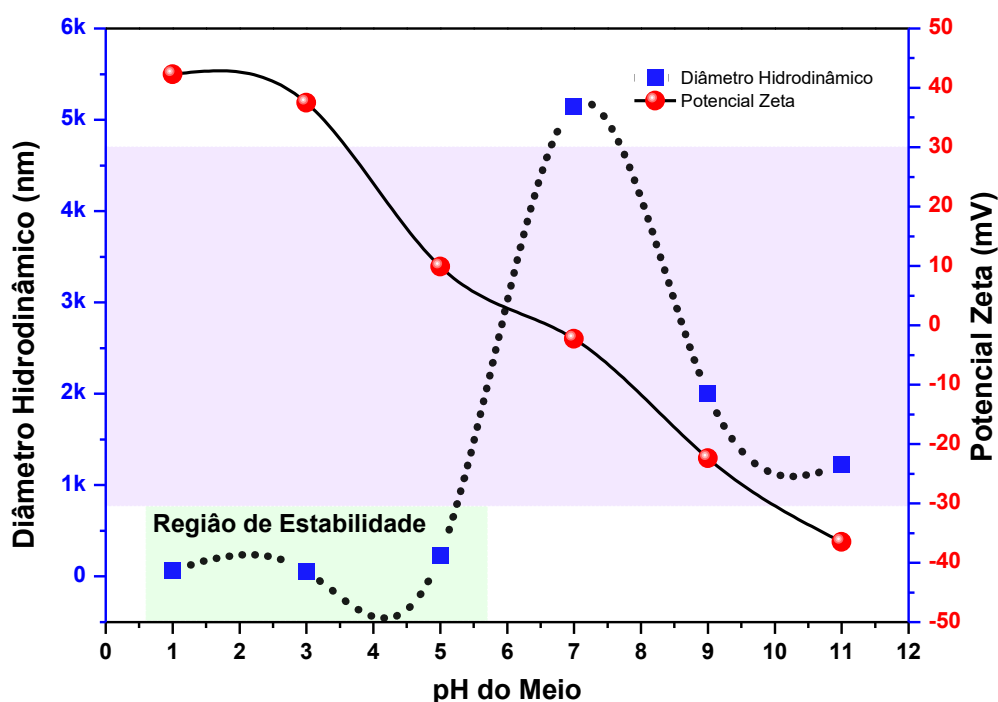
Figura 12 - Caracterização por Espectroscopia UV-visível da curva de pH das SPIONs@APTES.



Fonte: Elaborado pela Autora.

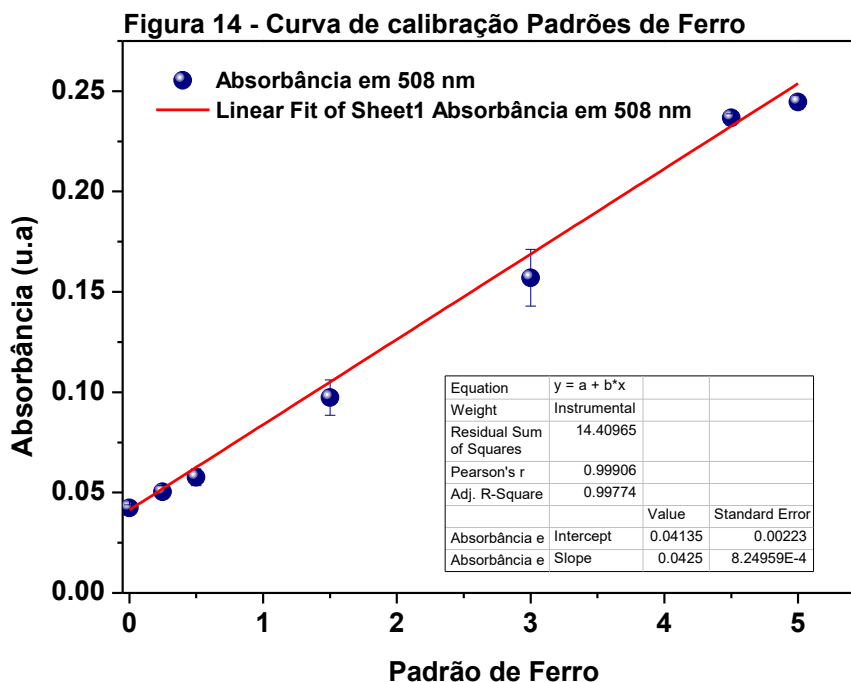
Na Figura 13 são apresentados os resultados da distribuição do diâmetro hidrodinâmico das SPIONs@APTES no modo número de partículas, bem como a relação do potencial Zeta e pH do meio da solução coloidal de SPIONs estáveis. Em meios básicos ocorreu uma desestabilização das nanopartículas, aumentando seu tamanho, enquanto na presença de meio ácido não houve alterações significativas de sua dimensão.

Figura 13 - Caracterização por Espectroscopia de correlação de fótons com e sem potencial da curva de pH das SPIONs@APTES.



Fonte: Elaborado pela Autora.

A quantificação de ferro foi determinada por meio da formação do complexo Fe (II)-ortofenantrolina, que apresenta absorvância máxima em 508 nm. As SPIONs utilizadas para o estudo da formação das nanossondas, após quantificadas apresentaram concentração de Fe_3O_4 igual a 3,04 mg/mL, que foi quantificada por meio da curva de calibração apresentada na Figura 14.



Fonte: Elaborado pela Autora.

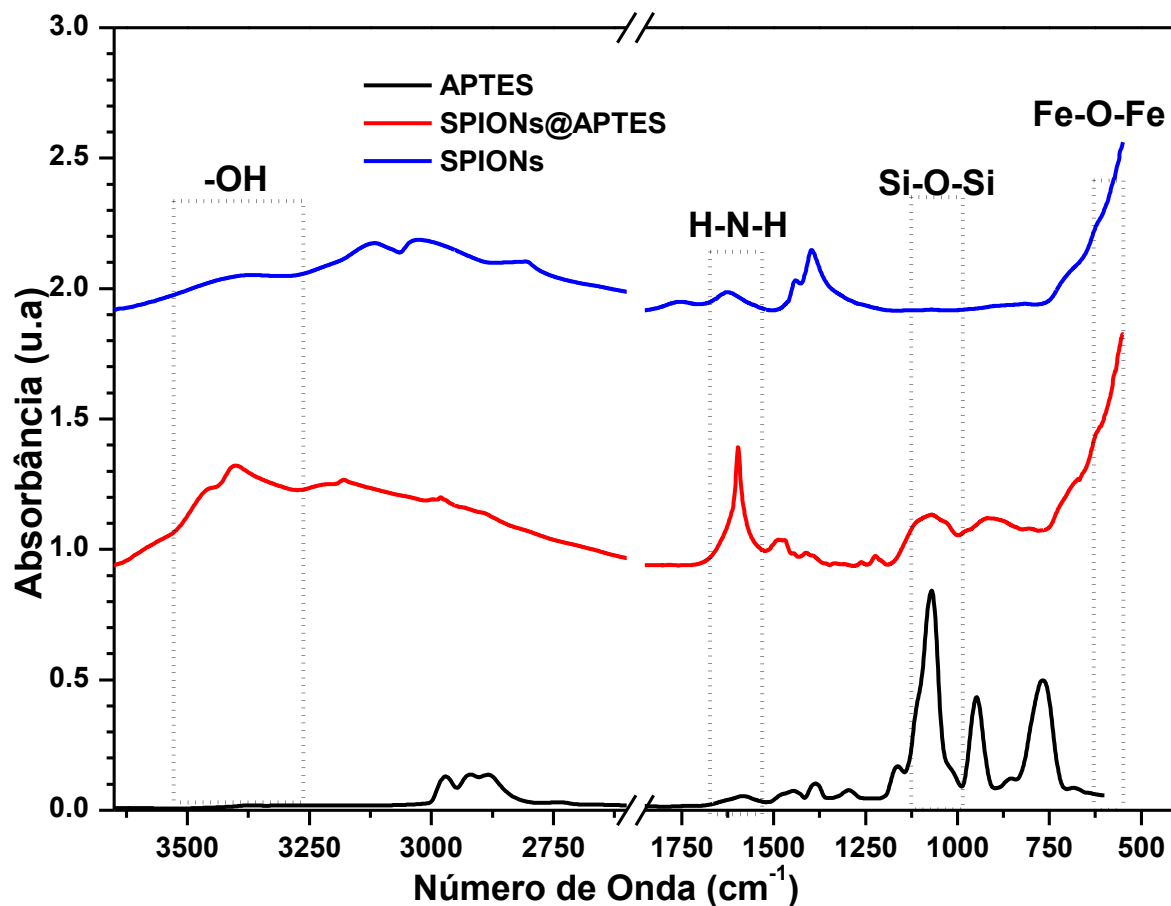
Na Figura 15 são apresentados os espectros de absorção por FT-IR do reagente estabilizante APTES, das SPIONs com e sem estabilização. As principais bandas observadas nesses espectros, bem como suas respectivas atribuições de grupos funcionais e modos vibracionais, estão reunidas na Tabela 1, permitindo a correlação entre as variações espectrais e as modificações superficiais decorrentes da funcionalização.

Tabela 1 - Atribuições de bandas do espectro FTIR do APTES, SPIONs e SPIONs@APTES.

Grupo Funcional	Banda (cm ⁻¹)	Atribuição da banda (cm ⁻¹)	Tipo de Vibração	Referência
Fe - O	627	500 - 635	Estiramento assimétrico	Marycz <i>et al.</i> , 2022; Stein <i>et al.</i> , 2020
Si - O	1073	900 - 1100	Estiramento assimétrico	Bellamy, 1975
N - H	1597	1580-1650	Deformação angular	Marycz <i>et al.</i> , 2022; Stein <i>et al.</i> , 2020
N - H	3395	3300 - 3400	Estiramento	Marycz <i>et al.</i> , 2022; Stein <i>et al.</i> , 2020
O - H	3400	3370 - 3450	Estiramento	Duszyńska <i>et al.</i> , 2020; Elbially; Fathy; Khalil, 2015

Fonte: Elaborado pela Autora.

Figura 15 - Espectros de FT-IR das SPIONs, SPIONs@APTES e APTES.

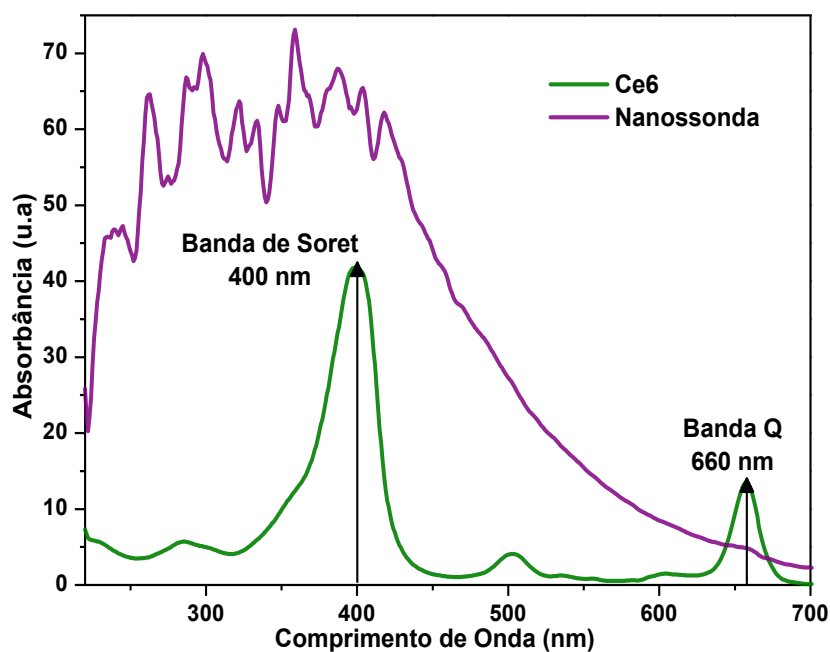


Fonte: Elaborado pela Autora.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS NANOSSONDAS

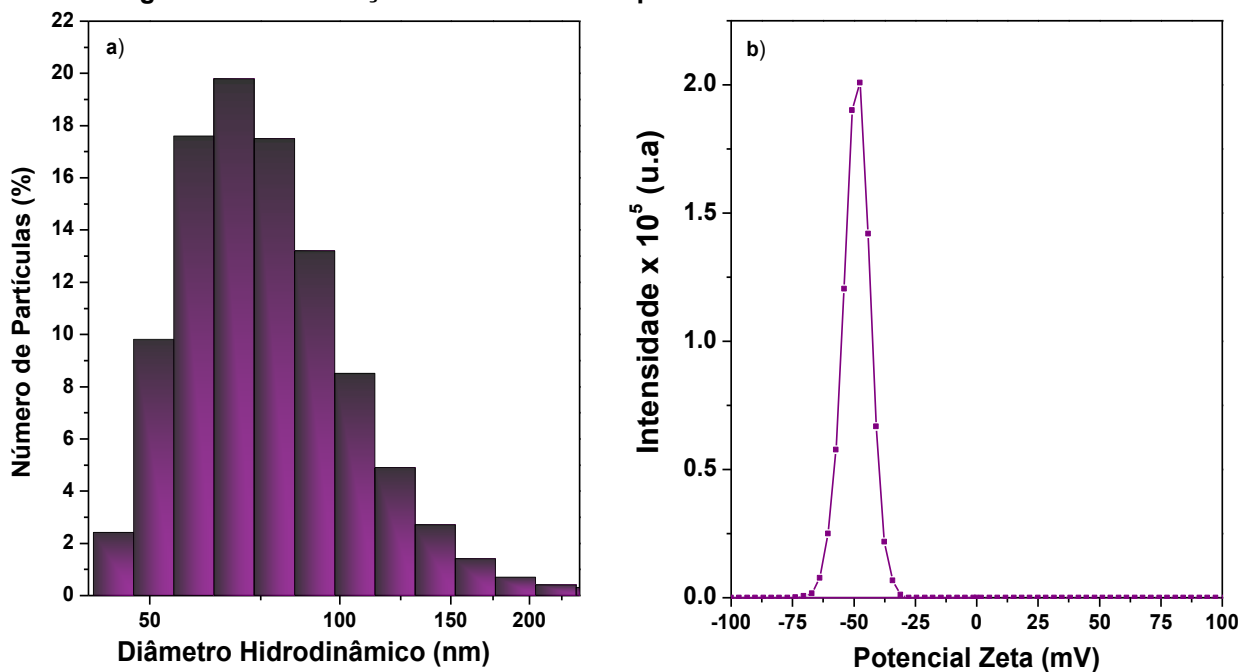
As nanossondas SPIONs@APTES funcionalizadas com a Ce6 foram produzidas via modificação química carbodiimida, nas quais há ligações entre os grupos carboxílicos do FS com os terminais amino das SPIONs@APTES. Na Figura 16 são apresentadas as caracterizações das nanossondas e da Ce6 por Espectroscopia UV-visível. As nanossondas apresentaram em seu espectro a Banda de Soret próximo de 400 nm e Banda Q em 660 nm, indicando que a Ce6 foi funcionalizada nas SPIONs@APTES.

Figura 16 - Espectro UV-visível das Nanossondas e da Ce6



Na Figura 17 são apresentados os dados de DLS, que indicaram tamanho hidrodinâmico médio de 82,80 nm com índice de polidispersividade (PDI) 0,177 (Figura 17a) e apresentarem um valor de Potencial Zeta médio de -32, mV (Figura 17b).

Figura 17 - Distribuição de tamanho e de potencial elétrico das Nanossondas.



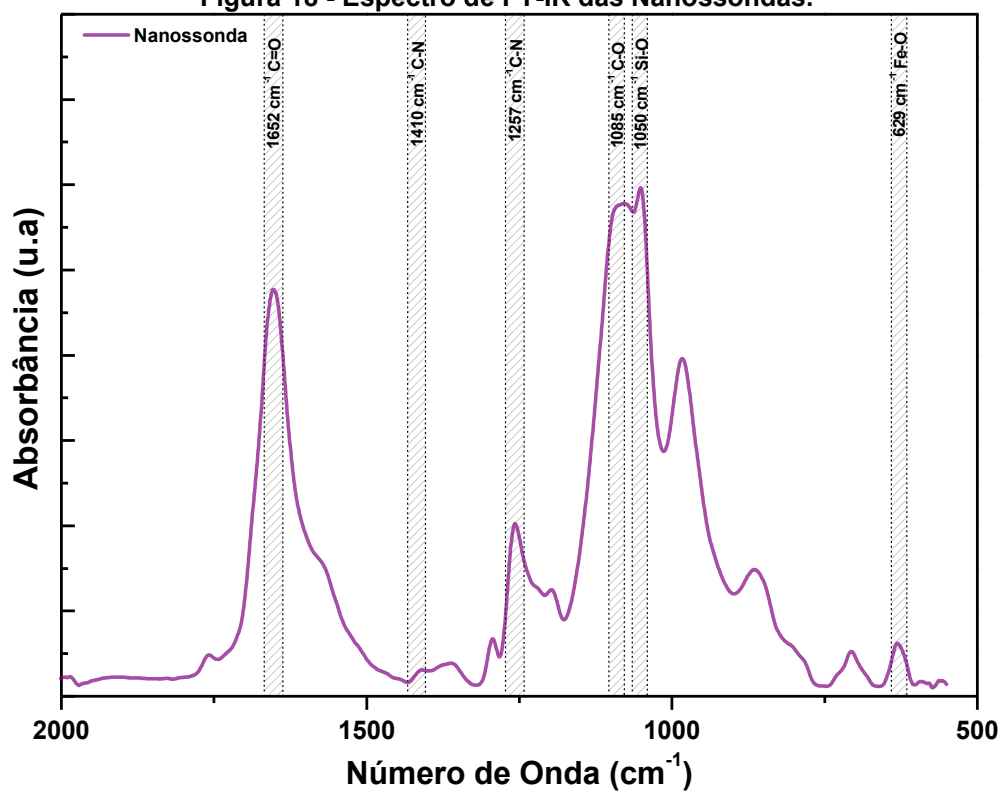
Na Figura 18 é apresentado o espectro de FT-IR da nanossonda, com a presença dos modos vibracionais das bandas 1085 cm^{-1} (C-O), 1257 e 1410 cm^{-1} (C-N) e 1652 cm^{-1} (C=O), que confirmam funcionalização do FS Ce6 nas SPIONs@APTES. As principais bandas observadas nesses espectros, bem como suas respectivas atribuições de grupos funcionais e modos vibracionais, estão reunidas na Tabela 2, permitindo a correlação entre as variações espectrais e as modificações superficiais decorrentes da funcionalização.

Tabela 2 - Atribuições de bandas do espectro FTIR da nanossondas.

Grupo Funcional	Banda (cm^{-1})	Atribuição (cm^{-1})	Tipo de Vibração	Referência
Fe - O	629	500 - 635	Estiramento assimétrico	Marycz <i>et al.</i> , 2022; Stein <i>et al.</i> , 2020
Si - O	1050	900 - 1100	Estiramento assimétrico	(Bellamy, 1975)
N - H	1085	1030 - 1120	Deformação angular	Marycz <i>et al.</i> , 2022; Stein <i>et al.</i> , 2020
C - N	1257	1100 - 1280	Deformação angular	Marycz <i>et al.</i> , 2022; Stein <i>et al.</i> , 2020
	1410	1400 - 1420	Estiramento simétrico	
C = O	1652	1652	Estiramento	(Duszyńska <i>et al.</i> , 2020; Elbialy; Fathy; Khalil, 2015)

Fonte: Elaborado pela Autora.

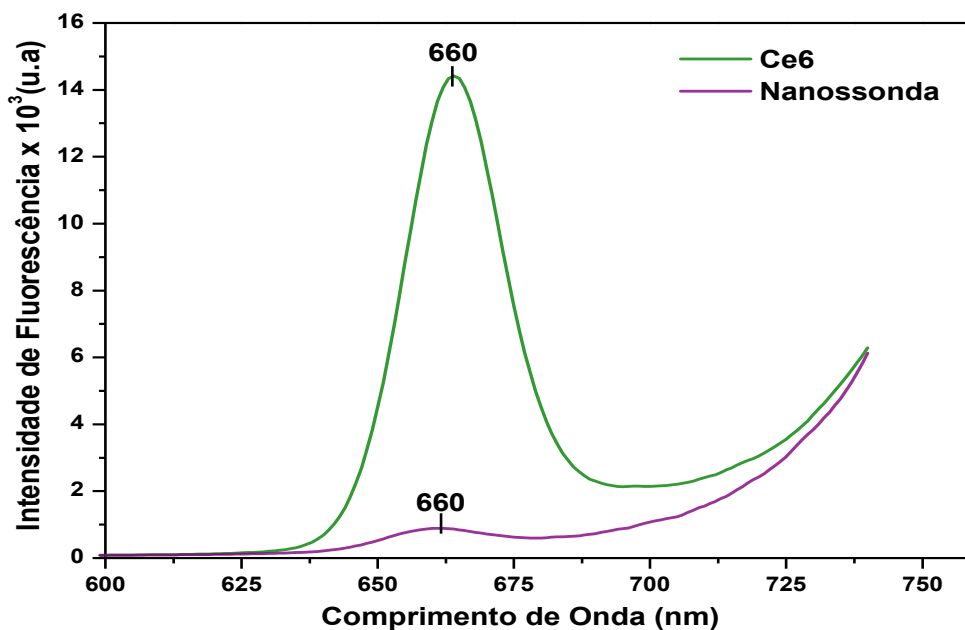
Figura 18 - Espectro de FT-IR das Nanossondas.



Fonte: elaborado pela Autora.

Na Figura 19 é apresentado o espectro da emissão de fluorescência das nanossondas produzidas comparada ao espectro de emissão da Ce6. A presença da banda de emissão no comprimento de onda de 660 nm confirma a funcionalização do FS as nanopartículas.

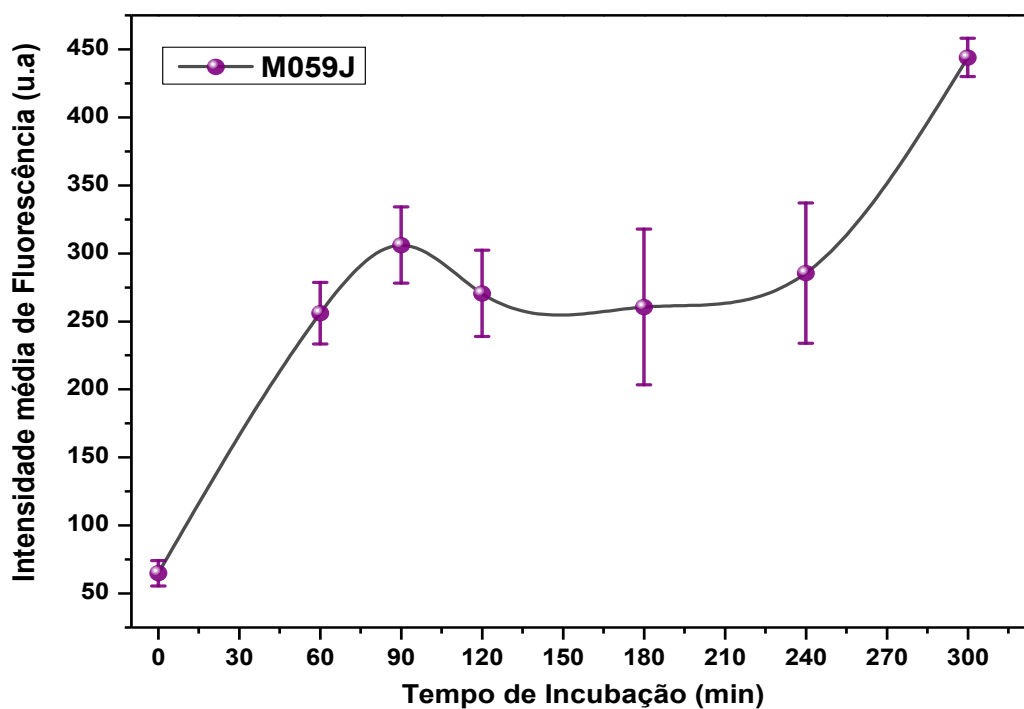
Figura 19 - Espectro comparativo da emissão de Fluorescência Nanossondas com a Ce6.



Fonte: Elaborado pela Autora.

A Figura 20 apresenta o tempo de internalização das Nanossondas na linhagem celular M059J, com tempos de incubação de 60, 90, 120, 180, 240 e 300 min.

Figura 20 - Análise do tempo de incorporação das nanossondas na linhagem celular M059J.

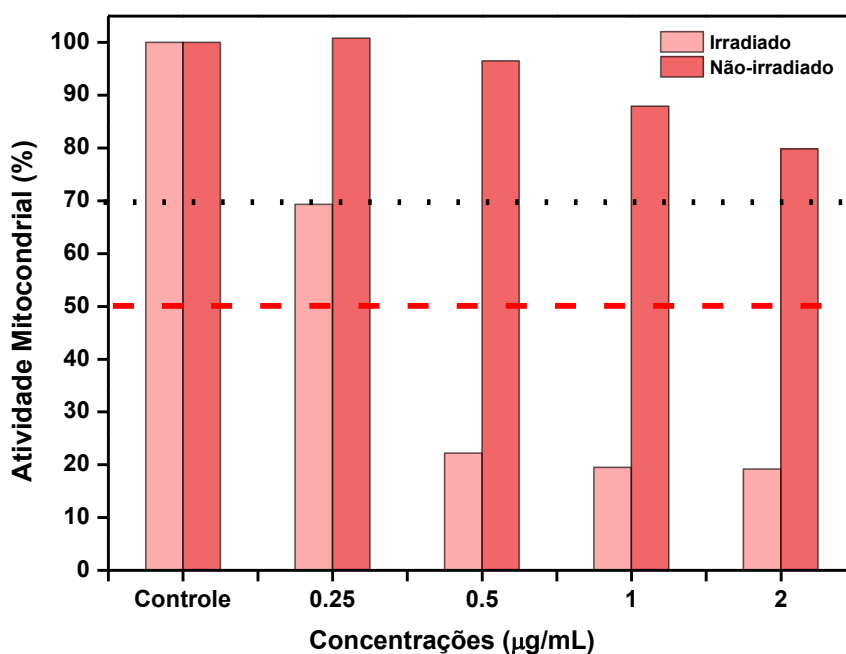


Fonte: Elaborado pela Autora.

Os testes de citotoxicidade das nanossondas na linhagem celular M059J foram realizados pela atividade mitocondrial, pelo método de exclusão do azul de tripan e complementada com o ensaio de resazurina.

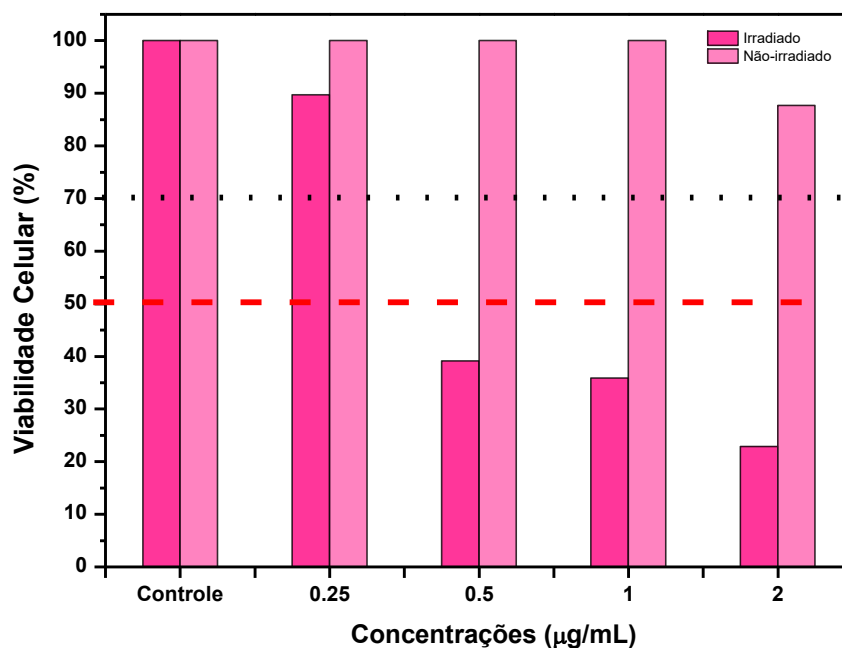
O teste de MTT foi realizado para investigar a variação do percentual de atividade mitocondrial após a aplicação das nanossondas, os resultados deste teste são apresentados na Figura 21. O grupo controle demonstrou um padrão de atividade mitocondrial de 100% estabelecendo um parâmetro de avaliação para os demais grupos de aplicação de nanossondas.

Figura 21 – Análise de MTT da Linhagem celular M059J



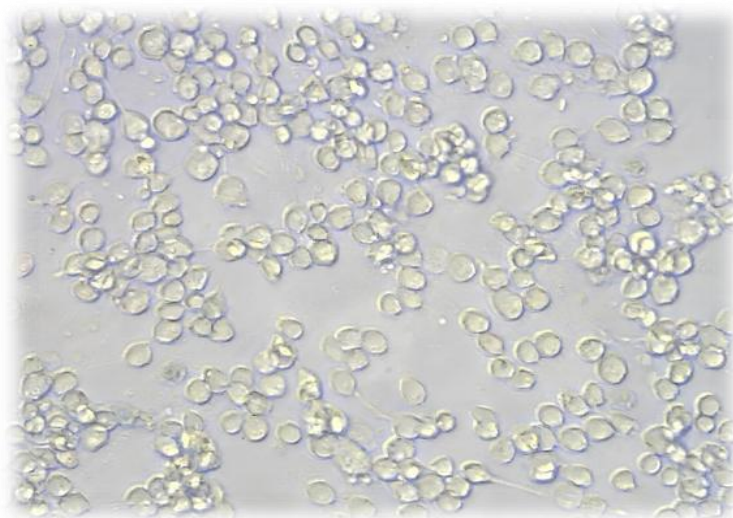
Fonte: Elaborado pela Autora.

Além dele, foi aplicado o método de exclusão com o corante Azul de Tripan, o qual permite-se diferenciar células viáveis de não viáveis com base na integridade da membrana plasmática, conforme apresentado na Figura 22.

Figura 22 - Análise da viabilidade celular pelo método de exclusão com Azul de Tripán

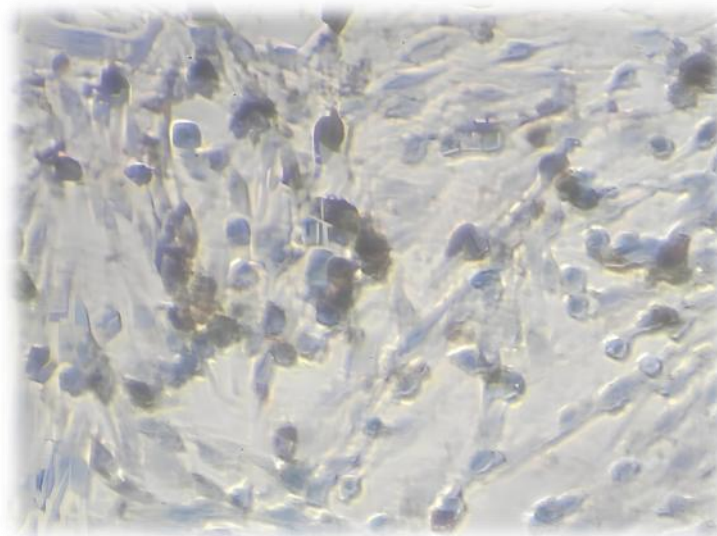
Fonte: Elaborado pela Autora.

Esse corante é impermeável às células viáveis, sendo excluído do citoplasma devido à integridade da membrana celular, como exemplificado na Figura 23, o grupo controle. No entanto, células danificadas ou mortas apresentam perda da seletividade, permitindo a penetração do corante e resultando em coloração azulada no citoplasma, exemplificada pela Figura 24, células pós aplicação da nanossonda.

Figura 23 – Grupo Controle no Método de exclusão com Azul de Tripán

Fonte: Elaborado pela Autora.

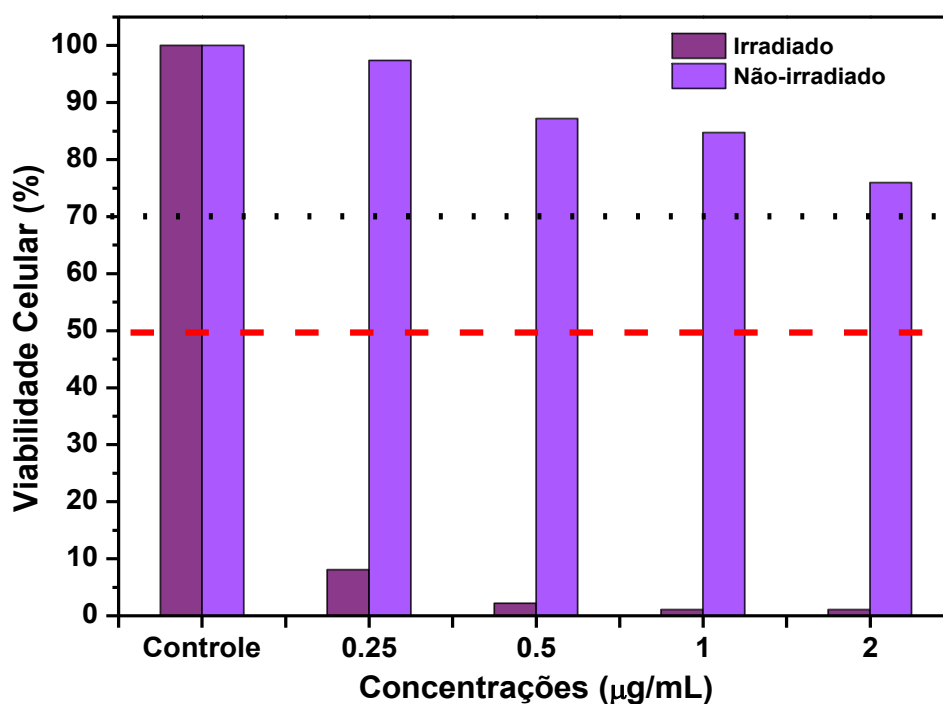
Figura 24 – Grupo com aplicação da nanossonda no Método de exclusão com Azul de Tripán



Fonte: Elaborado pela Autora.

Adicional ao teste de MTT e o método de exclusão, foi avaliada a atividade metabólica pelo ensaio de resazurina, técnica sensível que avalia o metabolismo celular por meio da conversão do corante em resorufina fluorescente. É possível observar na Figura 25 que as nanossondas não apresentam citotoxicidade na ausência de luz, corroborando com os outros ensaios.

Figura 25 - Análise da viabilidade celular pelo ensaio de resazurina.



Fonte: Elaborado pela Autora.

5 DISCUSSÃO

As SPIONs sintetizadas pelo método de coprecipitação química (Massart, 1981; Mérida *et al.*, 2015) apresentaram coloração preta característica e resposta a campo magnético externo, ímã de neodímio, indicando comportamento superparamagnético típico. A modificação superficial com APTES resultou em expressiva redução do diâmetro hidrodinâmico médio, além de maior uniformidade na distribuição de tamanho e melhoria na dispersão coloidal (Figura 11). Essa funcionalização também promoveu a inversão da carga superficial, conferindo estabilidade à suspensão, evidenciada por um valor de Potencial Zeta de +39,3 mV em meio ácido.

A estabilidade coloidal das SPIONs, após a modificação com o agente de acoplamento, foi investigada por espectroscopia UV-visível em diferentes valores de pH, conforme apresentado na Figura 12. O espectro revelou uma banda de absorção característica entre 300 e 400 nm. Em meios levemente ácidos a alcalinos, observou-se redução da absorção nas regiões de maior energia, associada à desestabilização da suspensão, visível pela sedimentação das nanopartículas. No entanto, em pH 11, as SPIONs@APTES apresentaram aumento da absorção nas regiões mais energéticas e não exibiram sinais de instabilidade coloidal. Por outro lado, em meios fortemente ácidos de pH entre 1 e 3, não se verificou redução na banda de absorção nem evidência de sedimentação, sugerindo estabilidade da suspensão nesse intervalo.

Segundo De Góis *et al.* (2019), nanopartículas de Fe_3O_4 apresentam padrão de absorção nos comprimentos entre 200 e 600 nm, atribuído às transições em orbitais d do ferro (De Góis *et al.*, 2019). De modo semelhante, Radoń *et al.* (2017) relataram bandas de absorção entre 330 e 450 nm para Fe_3O_4 (Radoń *et al.*, 2017), enquanto Abdullah *et al.* (2020) atribuíram a absorção próxima de 350 nm à presença desse óxido (Abdullah *et al.*, 2020). Assim, os resultados espectrais obtidos corroboram a formação de Fe_3O_4 nas SPIONs sintetizadas por coprecipitação.

A estabilidade coloidal das SPIONs@APTES foi avaliada por meio da análise do diâmetro hidrodinâmico e do potencial Zeta em função do pH (Figura 13).

Em meios levemente ácidos a alcalinos, observou-se aumento do diâmetro hidrodinâmico, indicando instabilidade coloidal. Em contrapartida, em pH fortemente ácido entre 1 e 3, não houve mudanças significativas em suas dimensões, caracterizando uma região de estabilidade. Este fato pode ser explicado pela interdependência entre pH, protonação de grupos superficiais e equilíbrio das forças coloidais (teoria DLVO). O revestimento com APTES introduz grupos amina ($-\text{NH}_2$) na superfície das SPIONs que, em meio ácido, ficam predominantemente protonados ($-\text{NH}_3^+$), conferindo carga positiva e forte repulsão eletrostática entre partículas — condição que explica a estabilidade observada em pH baixo (Sanità; Carrese; Lamberti, 2020; Villa *et al.*, 2016). À medida que o valor do pH aumenta, ocorre desprotonação dessas aminas e redução da carga positiva superficial; com a diminuição da repulsão eletrostática, as forças atrativas (van der Waals, interações hidrofóbicas e pontes iônicas) tornam-se mais evidentes, favorecendo agregação e aumento do diâmetro hidrodinâmico, conforme visto nos pHs de valores intermediários da curva (Vangijzegem *et al.*, 2023).

É importante destacar que a inversão ou diminuição do potencial Zeta por si só não determina estabilidade: o parâmetro relevante é o módulo do potencial (valor absoluto) e a presença de barreiras estéricas adicionais que impeçam o contato efetivo entre partículas. Em situações em que o módulo do Zeta se encontra na região entre ± 30 mV, a dupla elétrica pode ser insuficiente para estabilizar as partículas em meio com força iônica considerável, levando à agregação mesmo que o sinal do zeta seja negativo (Sanità; Carrese; Lamberti, 2020). Portanto, a interpretação dos dados de Figura 13 deve considerar tanto o valor do Zeta quanto o Pdl e a distribuição de tamanhos (modos intensidade/ número) obtida por DLS.

Cândido (2023) relata que SPIONs tendem à instabilidade em pH ácido, com aumento do diâmetro, enquanto, em pH superiores a 6, permanecem estáveis, apresentando valores de Potenciais Zeta negativos (Cândido, 2023). No entanto, neste estudo, as SPIONs funcionalizadas com APTES mostraram comportamento inverso: maior estabilidade coloidal foi observada em pH 1 a 3, com menores diâmetros hidrodinâmicos e carga superficial positiva, sugerindo sucesso na funcionalização. Contudo, em pH 11 observou-se a inversão do potencial Zeta para valores negativos acompanhada da perda da estabilidade coloidal, indicando que a funcionalização com APTES não se manteve eficaz em meio fortemente alcalino.

Os espectros de absorção por FT-IR do APTES, das SPIONs sem e com estabilização, foram apresentadas na Figura 15. A formação do óxido Fe_3O_4 foi confirmado pela presença da banda vibracional nas regiões entre 500 cm^{-1} a 635 cm^{-1} (Elbially; Fathy; Khalil, 2015; Li; Church; Woodhead, 2012; Namduri; Nasrazadani, 2008; Stein *et al.*, 2020). Entretanto, a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ também pode ser observada com bandas vibracionais na região de 560 cm^{-1} (Sklute *et al.*, 2018), o que dificulta a identificação exata do óxido formado por este tipo de análise. A presença das bandas vibracionais 627 cm^{-1} , 1073 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} e 3395 cm^{-1} confirmaram a estabilização das nanopartículas com o agente de acoplamento APTES, pela presença das bandas vibracionais do grupo (Fe-O) em 627 cm^{-1} estiramento assimétrico, em 1073 cm^{-1} estiramento assimétrico do grupo (Si-O), a vibração de deformação angular do grupo (N-H) em 1597 cm^{-1} e em 3395 cm^{-1} o estiramento do grupo (N-H) (Marycz *et al.*, 2022; Stein *et al.*, 2020). O modo de estiramento do grupo (-OH) localizado na superfície das nanopartículas de Fe_3O_4 ou de moléculas residuais de água adsorvidas em sua superfície está relacionada com a presença de uma banda alargada na região de 3370 cm^{-1} a 3450 cm^{-1} e também o modo de estiramento do grupo (N-H) localizado na região de 3300 cm^{-1} a 3400 cm^{-1} (Duszyńska *et al.*, 2020; Elbially; Fathy; Khalil, 2015).

A formação do complexo Fe (II)-ortofenantrolina proporcionou a quantificação de ferro nas SPIONs. Após quantificadas, pode-se determinar a concentração das SPIONs para o processo de funcionalização da Ce6.

A nanossonda foi sintetizada pela reação química carbodiimida, na qual ocorre ligações entre os grupos carboxílicos (COOH) do FS com as amins primárias (NH_2) presentes na superfície das nanopartículas, formando as ligações amídicas (C-N) e liberando água (H_2O) (Castilho; Hewitt; Raniero, 2017). Na Figura 16 foi mostrado a presença da banda de Soret próxima de 400 nm e da banda Q em 660 nm , confirmando a preservação das propriedades ópticas fundamentais da Ce6 após a conjugação às SPIONs@APTES. Essas duas regiões de absorção são típicas de moléculas derivadas de porfirinas, funcionando como indicadores da manutenção da estrutura e da funcionalidade do fotossensibilizador.

A banda de Soret, localizada em torno de 400 nm , corresponde a uma transição eletrônica intensa, em que elétrons da molécula são excitados por radiação de maior energia. Esse sinal atua como um marcador espectral

característico — uma espécie de impressão digital óptica da Ce6 —, assegurando que sua estrutura permaneceu preservada após a conjugação às nanopartículas. Já as bandas Q, observadas em torno de 660 nm, apresentam menor intensidade, mas maior relevância prática. Isso porque se situam na janela ótica biológica (650–900 nm), faixa espectral em que a luz consegue penetrar de forma mais eficiente nos tecidos e sofre menor absorção por componentes endógenos, como hemoglobina e água. Dessa forma, a preservação da banda Q garante que a Ce6 conjugada possa ser ativada de forma eficiente pela luz vermelha, desencadeando a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) essenciais à terapia fotodinâmica.

A comparação entre os espectros da Ce6 livre e das nanossondas evidencia que ambas as bandas foram preservadas, embora tenham ocorrido alterações de intensidade e perfil espectral. Essas mudanças podem ser atribuídas às interações entre os grupos carboxílicos da Ce6 e os grupos amina presentes na superfície das SPIONs funcionalizadas com APTES, que modificam o microambiente eletrônico do fotossensibilizador. Além disso, a absorção mais ampla registrada abaixo de 500 nm está associada à magnetita (Fe_3O_4), reforçando a contribuição do núcleo magnético para o comportamento óptico do sistema. Esses resultados estão em consonância com a literatura. Chen *et al.* (2024) e Zhou *et al.* (2021) relataram que nanopartículas magnéticas conjugadas à Ce6 mantêm as bandas de Soret e Q, embora com variações de intensidade atribuídas às interações de superfície (Chen *et al.*, 2024; Zhou *et al.*, 2021). Amirshaghghi, *et al.* (2019) destacaram que tais alterações podem reduzir a tendência da Ce6 à agregação, favorecendo maior estabilidade coloidal e eficiência fotodinâmica (Amirshaghghi *et al.*, 2019). De forma semelhante, SPIONs revestidos com ouro funcionalizados com Ce6 também preservaram bandas próximas a 402 nm (Soret) e 670 nm (Q), confirmando que a conjugação às nanopartículas não compromete as propriedades fotofísicas do fotossensibilizador (Cândido *et al.*, 2022).

Por fim, a mudança visual da coloração experimental, de preta (SPIONs e SPIONs@APTES) para um tom amarronzado mais claro após a conjugação, reforça qualitativamente a incorporação da Ce6 às nanopartículas. Assim, a análise espectroscópica, aliada às observações experimentais, evidencia que a Ce6 manteve sua funcionalidade óptica necessária para a geração de EROs, ao mesmo

tempo em que a conjugação proporcionou maior estabilidade coloidal e potencial terapêutico para aplicações.

A Figura 17 apresentou o diâmetro hidrodinâmico das nanossondas indicando que após a funcionalização com o FS houve uma redução de dimensão e uma inversão novamente da carga superficial, antes positiva (+39,3 mV) e após a conjugação passou a negativa com um valor de potencial médio de -32,5 mV. Essa inversão de sinal é compatível com mudanças químicas e físico-químicas de superfície ocorridas durante a reação de conjugação via carbodiimida (EDC/Sulfo NHS) e pode ser explicada por dois mecanismos principais que atuam de forma conjunta. Inicialmente, a funcionalização com o APTES introduz grupos amina primários ($-\text{NH}_2$) na superfície das SPIONs; em meio aquoso e a meios neutros, uma fração significativa dessas aminas está protonada ($-\text{NH}_3^+$), conferindo carga superficial positiva e elevando Potencial Zeta (Marycz *et al.*, 2022; Villa *et al.*, 2016). Durante a ativação e reação de carbodiimida, grupos carboxílicos da Ce6 são ativados e ligam se covalentemente às aminas superficiais formando ligações amídicas ($-\text{CONH}-$), o que consome aminas livres que anteriormente contribuíam para a carga positiva (Castilho; Hewitt; Raniero, 2017).

Paralelamente, a molécula da Ce6 contém grupos carboxílicos remanescentes que, no pH de medida, tendem a estar desprotonados como carboxilatos ($-\text{COO}^-$) e passam a predominar na interface expansiva externa após a conjugação. Mesmo que uma das carboxilas seja utilizada para a formação da amida, as demais podem permanecer expostas ao meio, gerando uma camada superficial com carga líquida negativa (Amirshaghghi *et al.*, 2019; Hak *et al.*, 2023). Assim, a conversão de $-\text{NH}_2$ em $-\text{CONH}-$ (neutralização parcial da carga positiva) combinada com a exposição de $-\text{COO}^-$ resulta na inversão do sinal do valor do Potencial Zeta de positivo para negativo (Vangijzegem *et al.*, 2023).

Além desses efeitos químicos, fatores conformacionais e coloidais também influenciam a magnitude do Potencial Zeta observado. A orientação preferencial das moléculas de Ce6 sobre a superfície pode favorecer a exposição dos grupos carboxilatos ao meio, aumentando a densidade de cargas negativas percebida pela camada dupla elétrica. Processos de lavagem e purificação podem ainda remover camadas adsorvidas de silano não totalmente condensado, expondo mais

eficientemente os grupos orgânicos da Ce6 e amplificando o efeito de carga negativa (Sanità; Carrese; Lamberti, 2020).

A redução do diâmetro hidrodinâmico observada após a conjugação é coerente, visto que a ligação covalente de Ce6 pode introduzir barreiras estéricas e elétricas que diminuem a tendência de agregação detectada por DLS, resultando em distribuição de tamanhos mais estreita e menor tamanho hidrodinâmico médio. Além disso, a inversão de carga altera as interações eletrostáticas entre partículas: se anteriormente havia forte atração/associação devido a neutralizações pontuais, a presença de carga negativa uniforme pode aumentar a repulsão e favorecer melhor dispersão (Sanità; Carrese; Lamberti, 2020; Villa *et al.*, 2016).

A análise de FT-IR apresentada na Figura 18 fornece evidências consistentes da conjugação da Ce6 às SPIONs@APTES. Observam-se bandas em 1652 cm^{-1} , 1257 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} e 1085 cm^{-1} que, em conjunto, sustentam a formação de ligações amídicas e a presença do fotossensibilizador na superfície nanoparticulada. Em particular, o pico em 1652 cm^{-1} é compatível com o estiramento C=O característico da banda Amida I, esperado após a reação carbodiimida (EDC/Sulfo-NHS) entre grupos (-COOH) da Ce6 e (-NH₂) do APTES, o que indica consumo de aminas superficiais e formação de (-CONH-) (Castilho; Hewitt; Raniero, 2017). As bandas em 1257 cm^{-1} e 1410 cm^{-1} são atribuíveis a modos (C-N) e a deformações angulares associadas a funções amídicas/oxi-orgânicas, reforçando a presença de fragmentos orgânicos da Ce6 ligados à superfície (Amirshaghghi *et al.*, 2019). A banda observada em 1085 cm^{-1} pode refletir vibrações (C-O) provenientes da própria Ce6 e, simultaneamente, contribuições de (Si-O) do revestimento silânico (APTES) na faixa $1000\text{--}1100\text{ cm}^{-1}$, indicando coexistência do filme silânico e do fotossensibilizador na interface nanopartícula-meio (Marycz *et al.*, 2022). Em conjunto, essas assinaturas vibracionais corroboram que a Ce6 foi incorporada quimicamente às SPIONs@APTES, em acordo com a rota de conjugação proposta.

A caracterização da emissão de fluorescência teve como objetivo confirmar a funcionalização do fotossensibilizador Ce6 às nanopartículas e a preservação de suas propriedades ópticas e sua análise foi conduzida por espectroscopia de fluorescência.

Observou-se um espectro de emissão semelhante ao da Ce6 livre, em torno de 660 nm (Figura 19). Sendo assim, a presença da banda espectral, mesmo com

menor intensidade no comprimento de onda característico da Ce6 quando excitada, corrobora o sucesso da incorporação da Ce6 à superfície das nanopartículas, além de indicar que suas propriedades ópticas foram preservadas após o processo de conjugação. Essa análise também demonstra que a Ce6 permanece ativa para aplicações em terapia fotodinâmica (Amirshaghghi *et al.*, 2019; Jalde *et al.*, 2018; Yao; Zhou, 2023; Zhao *et al.*, 2016).

A análise da internalização das nanossondas pela linhagem celular M059J (Figura 20) demonstrou que o maior acúmulo de nanopartículas ocorreu após 90 min de incubação. Esse resultado indica que esse é o tempo ideal para a entrada das nanossondas nas células tumorais. Após 120 min, houve uma redução na quantidade de nanossondas dentro das células, possivelmente devido a processos naturais de eliminação, com um leve aumento novamente em 300 min. Esses resultados mostram que as nanossondas utilizadas possuem bom desempenho para rápida captação celular, sendo promissor para aplicações biomédicas em terapias do câncer.

A avaliação da viabilidade celular por diferentes metodologias, apresentada nas Figuras 21, 22 e 23, revela resultados consistentes que demonstram a ausência de citotoxicidade significativa das nanossondas na ausência de irradiação. Esse achado é de particular relevância no contexto da TFD, uma vez que um dos critérios para a eficácia e segurança de um fotossensibilizador é a sua baixa toxicidade no escuro, preservando a viabilidade das células não expostas à luz e garantindo que o efeito citotóxico seja desencadeado apenas após a ativação luminosa (Oluwajembola *et al.*, 2024; Correia *et al.*, 2021).

No ensaio de MTT (Figura 21), observou-se que a atividade mitocondrial das células tratadas manteve-se próxima aos valores do grupo controle, indicando que o metabolismo oxidativo não foi prejudicado pela presença das nanossondas. Como este método se baseia na redução do sal de tetrazólio pela enzima succinato desidrogenase da cadeia respiratória mitocondrial, alterações negativas nesse parâmetro seriam indicativas de comprometimento funcional e possível indução de apoptose ou necrose. A manutenção da atividade enzimática observada neste estudo corrobora relatos prévios de sistemas nanoparticulados funcionalizados que exibem perfil de biocompatibilidade adequado antes da fotoativação (Domka *et al.*, 2023).

O ensaio de exclusão com Azul de Tripán (Figura 22), por sua vez, forneceu uma avaliação direta da integridade da membrana plasmática, parâmetro essencial para a manutenção da viabilidade celular. A elevada porcentagem de células viáveis observada sugere que não houve danos estruturais significativos, reforçando que, nas condições estudadas, as nanossondas não induziram necrose ou lise celular. Este resultado é particularmente importante quando analisado em conjunto com o MTT, pois a integridade de membrana é um marcador precoce de citotoxicidade aguda, enquanto a função mitocondrial reflete a manutenção da bioenergética celular.

A análise pelo ensaio de resazurina (Figura 23) complementa esses achados ao oferecer um indicador global do metabolismo celular, uma vez que este composto é reduzido pelas enzimas mitocondriais, citoplasmáticas e até mesmo por redutases presentes na membrana. A preservação da capacidade de redução da resazurina nas células tratadas confirma que o metabolismo celular permaneceu ativo e funcional na ausência de luz, reiterando a segurança das nanossondas em condições fisiológicas. Esse resultado está alinhado a estudos que destacam a importância da manutenção da função metabólica para minimizar efeitos adversos não desejados na TFD (Kwiatkowski *et al.*, 2018).

A consistência dos resultados obtidos por essas três metodologias, não apenas reforça a robustez das conclusões sobre a baixa toxicidade no escuro, mas também evidencia a importância de uma abordagem multimodal na avaliação de biocompatibilidade. Enquanto o MTT é específico para a atividade mitocondrial, o Azul de Tripán detecta diretamente danos à membrana, e a resazurina fornece uma visão abrangente do metabolismo celular. A convergência dos dados obtidos demonstra que as nanossondas estudadas atendem a um requisito fundamental para sua aplicação em TFD: a capacidade de permanecer biologicamente inertes até o momento da fotoativação, garantindo maior seletividade tumoral e segurança terapêutica.

6 CONCLUSÕES

As SPIONs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação e funcionalizadas com APTES com sucesso, quando se observou elevada estabilidade coloidal em meio ácido, redução significativa da agregação, características espectroscópicas compatíveis com a formação de Fe_3O_4 , como também a inversão dos valores de potencial Zeta pela disponibilidade de radicais amina na superfície das SPIONs@APTES. A incorporação da Ce6 foi confirmada por diferentes técnicas espectroscópicas, UV-Vis, fluorescência e FT-IR, indicando a preservação das propriedades óticas do fotossensibilizador e pela inversão do potencial Zeta. O ensaio de internalização demonstrou rápida e eficiente internalização das nanossondas pela linhagem celular M059J, sugerindo elevada afinidade com células tumorais. Os testes de biocompatibilidade multimodais MTT, Azul de Tripán e resazurina reforçaram o perfil de baixa toxicidade no escuro, evidenciando integridade de membrana, manutenção da função mitocondrial e metabolismo celular ativo na ausência de luz, característica essencial para aplicações seguras na TFD. Assim, os resultados obtidos sustentam que as SPIONs@APTES conjugadas com a Clorina E6 via química carbodiimida constituem uma plataforma promissora para TFD na terapia contra o câncer, unindo direcionamento magnético, estabilidade coloidal, internalização celular eficiente e segurança biológica pré-ativação.

REFERÊNCIAS

- ABDULLAH, J. A. A. *et al.* Green synthesis and characterization of iron oxide nanoparticles by pheonix dactylifera leaf extract and evaluation of their antioxidant activity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, [s. l.], v. 17, p. 100280, 2020.
- ABOUSHOU SHAH, S. *et al.* Toxicity and biodistribution assessment of curcumin-coated iron oxide nanoparticles: Multidose administration. **Life Sciences**, [s. l.], v. 277, p. 119625, 2021.
- AFFATIGATO, L. *et al.* Ferritin-Coated SPIONs as New Cancer Cell Targeted Magnetic Nanocarrier. **Molecules**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 1163, 2023. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1420-3049/28/3/1163>. Acesso em: 22 set. 2025.
- AMIRSHAGHAGHI, A. *et al.* Chlorin e6-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticle (SPION) Nanoclusters as a Theranostic Agent for Dual-Mode Imaging and Photodynamic Therapy. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2019.
- ANSARI, M. J. *et al.* Synthesis and Stability of Magnetic Nanoparticles. **BioNanoScience**, v. 12, n. 2, p. 627–638, 2022.
- AZIMIZONUZI, H. *et al.* A state-of-the-art review of the recent advances of theranostic liposome hybrid nanoparticles in cancer treatment and diagnosis. **Cancer Cell International**, v. 25, n. 1, p. 26, 2025.
- BEGUM, A. *et al.* Cytotoxicity of Iron Nanoparticles Synthesized Using Dried Ginger. **Journal of Pharmaceutical Research International**, v. 32., n. 25, p. 112–118, 2 nov. 2020. DOI: 10.9734/jpri/2020/v32i2530829
- BELLAMY, L. J. **The infra-red spectra of complex molecules**. 3rd ed. London: Chapman and Hall, 1975.
- BERRIDGE, Michael V.; HERST, Patries M.; TAN, An S. Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. **Biotechnology annual review**, v. 11, p. 127-152, 2005.
- CÂNDIDO, M. A. **Síntese e Caracterização de Au@SPIONs Funcionalizadas com EGF para Diagnóstico do Câncer de Mama e Tratamento por Terapias Fotodinâmica e Fototérmica**. São José dos Campos, SP, 2023. 126 f. Dissertação (Doutorado em Engenharia Biomédica) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2023
- CÂNDIDO, M. A. *et al.* Gold-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles functionalized to EGF and Ce6 complexes for breast cancer diagnoses and therapy. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 1, p. 100, 2022.
- CARRESE, Barbara; SANITA, Gennaro; LAMBERTI, Annalisa. Nanoparticles design for theranostic approach in cancer disease. **Cancers**, v. 14, n. 19, p. 4654, 2022.
- CASTILHO, M. L.; HEWITT, K. C.; RANIERO, L. FT-IR characterization of a

theranostic nanoprobe for photodynamic therapy and epidermal growth factor receptor targets. **Sensors and Actuators, B: Chemical**, v. 240, p. 903–908, 2017.

CHEN, G.-H. *et al.* Mutually reinforced cancer treatment based on phototherapy combined with ferroptosis. **Chemical Engineering Journal**, [s. l.], v. 493, p. 152397, 2024. Disponível em: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1385894724038841>. Acesso em: 22 set. 2025.

CORREIA, J. H. *et al.* Photodynamic therapy review: principles, photosensitizers, applications, and future directions. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 1332, 2021.

CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides**: structure, properties, reactions, occurrences and uses. Chichester: John Wiley & Sons, 2003.

CREȚU, B. E. B. *et al.* Imaging constructs: The rise of iron oxide nanoparticles. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 1–45, 2021.

DE GÓIS, M. M. *et al.* Bi₂₅FeO₄₀– Fe₃O₄– Fe₂O₃ composites: Synthesis, structural characterization, magnetic and UV–visible photocatalytic properties. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 785, p. 598-602, 2019.

DIEZ-PASCUAL, A. M.; RAHDAR, A. Functional nanomaterials in biomedicine: current uses and potential applications. **ChemMedChem**, v. 17, n. 16, p. e202200142, 2022.

DOMKA, W. *et al.* Photodynamic therapy in brain cancer: mechanisms, clinical and preclinical studies and therapeutic challenges. **Frontiers in Chemistry**, v. 11, p. 1–15, 2023. <https://doi.org/10.3389/fchem.2023.1250621>

DUSZYŃSKA, A. *et al.* Influence of electron-beam irradiation on surface properties of magnetic iron oxide nanoparticles stabilized with citrate. **Radiation Physics and Chemistry**, [s. l.], v. 169, p. 107796, 2020.

EBRAHIMINEZHAD, A. *et al.* Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.net Impacts of Amine Functionalized Iron Oxide Nanoparticles on HepG2 Cell Line. **Current Nanoscience**, v. 11, n. 1, p. 113-119, 2015.

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, p. 76–83, 1 ago. 2019.

ELBIALY, N. S.; FATHY, M. M.; KHALIL, W. M. Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 490, n. 1–2, p. 190–199, 2015.

FATHY, Mohamed M. *et al.* Combined chemo-photothermal therapy of metastatic mammary adenocarcinoma using curcumin-coated iron oxide nanoparticles. **BioNanoScience**, v. 11, n. 2, p. 447-453, 2021.

FRIEDRICH, B. **Peptide-functionalised SPIONs for the removal of pathogens.**

2023. Tese (Doutorado em Engenharia) – Technische Fakultät, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg, Erlangen, 2023.

GAN, S. *et al.* Recent Advances in Hydrogel-Based Phototherapy for Tumor Treatment. **Gels**, [s. l.], v. 9, n. 4, p. 286, 2023.

HAK, A. *et al.* Chlorin e6: A Promising Photosensitizer in Photo-Based Cancer Nanomedicine. **ACS Applied Bio Materials**, v. 6, n. 2, p. 349–364, 2023.

HEDAYATNASAB, Z. *et al.* Synthesis and in-vitro characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles using a sole precursor for hyperthermia therapy. **Materials Research Bulletin**, [s. l.], v. 132, p. 110975, 2020. set. 2025.

HU, Y. *et al.* Construction of iron oxide nanoparticle-based hybrid platforms for tumor imaging and therapy. **Chemical Society Reviews**, v. 47, n. 5, p. 1874-1900, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa 2023: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2022a.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer do sistema nervoso central: tipos, sinais e prevenção**. Rio de Janeiro: INCA, 2022b

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer Today**. Lyon, France: IARC, 2024.

JABBAR, K. Q.; BARZINJY, A. A.; HAMAD, S. M. Iron oxide nanoparticles: Preparation methods, functions, adsorption and coagulation/flocculation in wastewater treatment. **Environmental Nanotechnology, Monitoring and Management**, v. 17, p. 100661, 2022.

JALDE, S. S. *et al.* Synthesis of novel Chlorin e6-curcumin conjugates as photosensitizers for photodynamic therapy against pancreatic carcinoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 147, p. 66–76, 2018.

JIAO, W. *et al.* Design of magnetic nanoplatfoms for cancer theranostics. **Biosensors**, v. 12, n. 1, p. 38, 2022.

KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy–mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 106, p. 1098-1107, 2018.

LI, J. *et al.* Nanoparticles-based phototherapy systems for cancer treatment: Current status and clinical potential. **Bioactive Materials**, v. 23, n. December 2022, p. 471–507, 2023.

LI, Y. S.; CHURCH, J. S.; WOODHEAD, A. L. Infrared and Raman spectroscopic studies on iron oxide magnetic nano-particles and their surface modifications. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 324, n. 8, p. 1543–1550, abr. 2012.

MAI, T.; HILT, J. Z. Functionalization of iron oxide nanoparticles with small molecules and the impact on reactive oxygen species generation for potential cancer therapy.

Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 576, p. 9–14, 2019.

MANESCU (PALTANEA), V. *et al.* Magnetic Hyperthermia in Glioblastoma Multiforme Treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 25, n. 18, p. 10065, 2024.

MARYCZ, K. *et al.* Aminopropyltriethoxysilane (APTES)-Modified Nanohydroxyapatite (nHAp) Incorporated with Iron Oxide (IO) Nanoparticles Promotes Early Osteogenesis, Reduces Inflammation and Inhibits Osteoclast Activity. **Materials**, v. 15, n. 6, p. 2095, 2022.

MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981. DOI: 10.1109/TMAG.1981.1061188.

MÉRIDA, F. *et al.* Optimization of synthesis and peptization steps to obtain iron oxide nanoparticles with high energy dissipation rates. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 394, p. 361–371, 15 jul. 2015.

MOKHOSI, S. R. *et al.* Advances in the Synthesis and Application of Magnetic Ferrite Nanoparticles for Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 14, n. 5, p. 937, 2022. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/14/5/937>. Acesso em: 23 set. 2025.

MOLKENOVA, A. *et al.* Designing inorganic nanoparticles into computed tomography and magnetic resonance (CT/MR) imaging-guidable photomedicines. **Materials Today Nano**, [s. l.], v. 18, p. 100187, 2022.

NAMDURI, H.; NASRAZADANI, S. Quantitative analysis of iron oxides using Fourier transform infrared spectrophotometry. **Corrosion Science**, v. 50, n. 9, p. 2493–2497, set. 2008.

NEDYALKOVA, M. *et al.* Iron oxide nanoparticles–in vivo/in vitro biomedical applications and in silico studies. **Advances in colloid and interface science**, v. 249, p. 192-212, 2017.

OLUWAJEMBOLA, A. M. *et al.* Photosensitizers in photodynamic therapy: An advancement in cancer treatment. **Results in Chemistry**, v. 10, p. 101715, 2024.

PAWLIK, P. *et al.* Application of iron-based magnetic nanoparticles stabilized with triethanolammonium oleate for theranostics. **Journal of Materials Science**, v. 57, n. 7, p. 4716–4737, 2022.

POUYAN, A. *et al.* Glioblastoma multiforme: insights into pathogenesis, key signaling pathways, and therapeutic strategies. **Molecular Cancer**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 58, 2025.

RADOŃ, A. *et al.* Structure and optical properties of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by co-precipitation method with different organic modifiers. **Materials Characterization**, v. 131, p. 148-156, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.06.031>.

ROST, N. C. V. **Iron oxide nanoparticles synthesis optimized by design of experiments and magnetic particle imaging performance of magnetoliposomes.** São José dos Campos, SP, 2021. 121 f.; 1 disco laser. Tese (Doutorado em Física e Astronomia) - Universidade do Vale do Paraíba, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, São José dos Campos, 2021. Disponível em: <https://biblioteca.univap.br/pergamumweb/vinculos/00005e/00005e48.pdf>. Acesso em: 7 out. 2021.

SACHDEVA, V. *et al.* Iron Oxide Nanoparticles: The precise strategy for targeted delivery of genes, oligonucleotides and peptides in cancer therapy. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, [s. l.], v. 74, p. 103585, 2022.

SANITÀ, G.; CARRESE, B.; LAMBERTI, A. Nanoparticle surface functionalization: how to improve biocompatibility and cellular internalization. **Frontiers in molecular biosciences**, v. 7, p. 587012, 2020.

SANTOS, J. F. **Exploring iron oxide nanoparticles coating and stability for magnetic hyperthermia applications.** 2023. Dissertação (Mestrado em Biomateriais e Nanomedicina) – NOVA School of Science and Technology, NOVA University Lisbon, Lisboa, 2023.

SHABATINA, Tatyana I. *et al.* Magnetic nanoparticles for biomedical purposes: Modern trends and prospects. **Magnetochemistry**, v. 6, n. 3, p. 30, 2020.

SIGMA-ALDRICH. **Sigma-Aldrich: Analytical, Biology, Chemistry & Materials Science products.** 2024. Disponível em: <https://www.sigmaaldrich.com>. Acesso em: 18 set. 2024.

SKLUTE, E. C. *et al.* Spectral and morphological characteristics of synthetic nanophase iron (oxyhydr)oxides. **Physics and Chemistry of Minerals**, v. 45, n. 1, p. 1–26, 2018.

STEIN, R. *et al.* Synthesis and Characterization of Citrate-Stabilized Gold-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. **Molecules**, [s. l.], v. 25, n. 19, p. 4425, 2020.

TEN HOVE, M. *et al.* Engineered SPIONs functionalized with endothelin a receptor antagonist ameliorate liver fibrosis by inhibiting hepatic stellate cell activation. **Bioactive Materials**, v. 39, p. 406–426, 1 set. 2024.

TSAVE, O. *et al.* Functional polysaccharide-coated SPIONs for in vitro mRNA delivery in breast cancer cells. **Materials Advances**, v. 5, n. 13, p. 5410–5432, 2024.

UNNI, M. *et al.* Thermal Decomposition Synthesis of Iron Oxide Nanoparticles with Diminished Magnetic Dead Layer by Controlled Addition of Oxygen. **ACS Nano**, v. 11, n. 2, p. 2284–2303, 28 fev. 2017.

VANGIJZEGEM, T. *et al.* Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPION): From Fundamentals to State-of-the-Art Innovative Applications for Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. 236, 2023.

VIEIRA, P. *et al.* Specific nanomarkers fluorescence: in vitro analysis for EGFR

overexpressed cells in triple-negative breast cancer and malignant glioblastoma. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 39, p. 102997, 2022.

VILLA, S. *et al.* Functionalization of Fe₃O₄ NPs by silanization: Use of amine (APTES) and thiol (MPTMS) silanes and their physical characterization. **Materials**, v. 9, n. 10, 12 out. 2016.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Cancer fact sheet**. Geneva: WHO, 2022.

WU, Y. *et al.* Surface modification of iron oxide-based magnetic nanoparticles for cerebral theranostics: Application and prospection. **Nanomaterials**, v. 10, n. 8, p. 1441, 2020.

WU, W. *et al.* 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.

YAO, H.; ZHOU, J. Y. Chlorin e6-modified iron oxide nanoparticles for photothermal-photodynamic ablation of glioblastoma cells. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 11, n. July, p. 1–8, 2023.

YU, S. *et al.* Application of nanomaterials in diagnosis and treatment of glioblastoma. **Frontiers in Chemistry**, [s. l.], v. 10, p. 1063152, 2022.

ZHAO, L. *et al.* Efficient delivery of chlorin e6 into ovarian cancer cells with octalysine conjugated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for effective photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 4, n. 47, p. 7741–7748, 2016.

ZHOU, J. *et al.* Gas-assisted phototherapy for cancer treatment. **Journal of Controlled Release**, v. 360, p. 564–577, Mar. 2023.

ZHOU, Z. *et al.* Advances in photosensitizer-related design for photodynamic therapy. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 6, p. 668-686, 2021.