

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

Marcela Aparecida Cândido

**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

Marcela Aparecida Cândido

Síntese e Caracterização de Au@SPIONs Funcionalizadas com EGF para Diagnóstico do Câncer de Mama e Tratamento por Terapias Fotodinâmica e Fototérmica

Tese de Doutorando apresentada ao programa de Pós-graduação em Engenharia Biomédica da Universidade do Vale do Paraíba, como complementação dos créditos necessários para obtenção do grau de Doutora em Engenharia Biomédica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Raniero

São José dos Campos, SP
2023

TERMO DE AUTORIZAÇÃO DE DIVULGAÇÃO DA OBRA

Ficha catalográfica

Cândido, Marcela Aparecida

Síntese e Caracterização de Au@SPIONs Funcionalizadas com EGF para Diagnóstico do Câncer de Mama e Tratamento por Terapias Fotodinâmica e Fototérmica / Marcela Aparecida Cândido; orientadora, Prof. Dr. Leandro José Raniero. - São José dos Campos, SP, 2023.

1 CD-ROM, 125 p.

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

Inclui referências

1. Engenharia Biomédica. 2. Neoplasias da Mama. 3. Nanomedicina Teranóstica. 4. Fotoquimioterapia. 5. Terapia Fototérmica. I. Raniero, Prof. Dr. Leandro José, orient. II. Universidade do Vale do Paraíba. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica. III. Título.

Eu, Marcela Aparecida Cândido, 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, 4 de Abril de 2023.



Autor(a) da Obra

Data da defesa: 06 / 03 / 2023

MARCELA APARECIDA CÂNDIDO

**“SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE Au@SPIONs FUNCIONALIZADAS COM EGF
PARA DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA E TRATAMENTO POR TERAPIAS
FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA”.**

Dissertação aprovada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor, 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. Dr. Leandro José Raniero	<i>Leandro José Raniero</i>
Prof.ª Dr.ª Ivone Regina de Oliveira	<i>Ivone Regina de Oliveira</i>
Prof.ª Dr.ª Dayane Batista Tada	<i>Dayane Batista Tada</i>
Prof.ª Dr.ª Andrea Porto Carreiro Campos	<i>Andrea Porto Carreiro Campos</i>

Prof.ª Dr.ª Lúcia Vieira

Diretora do IP&D – Univap

São José dos Campos, 06 de março de 2023.

Agradeço primeiramente 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 Dirceu e Cleide, minhas irmãs Gabriela e Tatiane, meus sobrinhos Júlia, Mateus e Davi por todo amor, cuidado, ajuda e carinho.

A todos do laboratório de Nanossensores, todos os alunos de Doutorado, 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 que estiveram presente durante esta fase, Nathanne, Paula, Thais, Viviane, Ingrid, Luz, Virgínia e Livia, pela amizade que construímos, por todos cafés e por transmitirem seus conhecimentos comigo.

A todos meus amigos em especial Tatiane, Raissa, Deyse, Bianca e Larissa que ouviram quando sempre precisei, sempre me incentivaram e estiveram comigo ao longo deste período.

À Ms. Priscila Maria Marciano Leite, por toda ajuda na caracterização inicial por microscopia das nanopartículas. À Angela e o Kennedy por toda ajuda na caracterização das estruturas cristalinas das nanopartículas e o Bruno pelo auxílio na caracterização da câmara de irradiação.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro José Raniero, por compartilhar seu conhecimento, sua atenção, disponibilidade e por acreditar em mim, até mais que eu mesma. Quero te agradecer por ter me dado a oportunidade de conhecer o universo da nanotecnologia, desde a primeira síntese de nanopartículas de ouro, as funcionalizações com os oligonucleotídeos, até a formação das nanopartículas *core-shell*. Muitas vezes me questioneei achando que não conseguiria, e você sempre esteve me incentivando e fazendo acreditar que tudo daria certo. Obrigada por todo carinho, por todas as conversas, cafés com chocolate, balas de hortelã, conselhos e me desculpe pela minha teimosia.

Agradeço a Prof.^a Dra. Cristina, pelo suporte nos conhecimentos da área biológica, pela disponibilidade no uso dos equipamentos, pelas análises de Citometria de Fluxo e Microscopia Confocal, bem como pelo apoio durante todo desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a pesquisadora Dra. Andrea Campos por toda ajuda, disponibilidade e suporte nas medidas de Microscopia Eletrônica de Transmissão das nanopartículas. Aos Prof. Dr. Antônio Domingues dos Santos e pesquisador Dr. Sérgio

Antônio Romero por todo o suporte e disponibilidade na caracterização da magnetização das nanopartículas. Ao Prof. Dr. Alessandro por todo suporte e montagem da câmara de irradiação para que fosse possível realizar os experimentos com a células.

Aos professores doutores do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento por sempre estarem dispostos a cederem seus laboratórios, em especial: Ivone de Oliveira Regina, Maricilia Silva Costa, Liu Yao Cho.

Todos os professores do Programa de Pós-Graduação, os funcionários da direção, secretaria, biblioteca, portaria e limpeza do Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, pelo trabalho e dedicação em manter o nosso ambiente de trabalho sempre acolhedor. Agradeço também à UNIVAP por toda infraestrutura para realizar a pesquisa e pela bolsa da fundação e à FAPESP pela bolsa concedida (processo número: 2019/26353-3).

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

Muito obrigada!

“A ciência nunca resolve um problema sem criar pelo menos outros dez”.

(George Bernard Shaw)

RESUMO

O câncer de mama é caracterizado pela presença de neoplasias malignas, com alto grau de proliferação e, sendo a principal causa de morte em mulheres nos últimos anos. Os tratamentos disponíveis são geralmente agressivos e com baixa eficácia, dependendo do subtipo molecular. Sendo assim, se faz necessário desenvolver novos métodos de detecção, quando a nanotecnologia pode proporcionar diagnósticos precoces e tratamentos efetivos. As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, SPIONs) podem ser revestidas com fina camada de ouro e funcionalizadas, o que potencializa sua aplicação biomédica para formação de um biossensor sensível, rápido e preciso como agentes de terapia do câncer. As terapias fotodinâmica (TFD) e fototérmica (TFT) têm sido utilizadas no tratamento do câncer, sendo o seu mecanismo de ação baseado na interação de moléculas fotossensíveis com radiação de comprimento de onda adequado, na presença de oxigênio molecular. No entanto, cada passo deve ser controlado com precisão para obter um tratamento eficiente. Nesse contexto, a presente tese propõe a síntese de SPIONs pelo método de coprecipitação, o revestimento com ouro para obter Au@SPIONs, a funcionalização com a proteína EGF e o fotossensibilizador Clorina e6 para produção de Nanossondas Teranósticas (NTs) e sua aplicação na TFD e TFT. As dimensões das nanoestruturas foram caracterizadas por tamanhos físico e hidrodinâmico, bem como a morfologia, estabilidade coloidal, estrutura cristalina, composição química e propriedades magnéticas. Posteriormente foram realizados estudos *in vitro* para avaliação da atividade antitumoral e toxicológica da TFT e TFD nas linhas celulares MCF 10A e MDA-MB-468. As NTs apresentaram internalização no citoplasma e no núcleo de algumas células da linhagem celular MDA-MB-468. Após os tratamentos com as NTs obteve-se percentuais significativos de apoptose na linhagem celular MDA-MB-468 e níveis crescentes de ERO's após TFD. No estudo com a cultura 3D da linhagem celular MDA-MB-468, as NTs apresentaram resultados que corroboraram com o estudo inicial 2D, sendo observado a capacidade de penetração das NTs nos esferóides com a variação do tempo de incubação.

Palavras-chave: Nanossonda Teranóstica. Nanofármaco. Terapia Fotodinâmica. Terapia Fototérmica. Diagnóstico. Câncer de mama.

Synthesis and Characterization of Au@SPIONs Functionalized with EGF for Breast Cancer Diagnosis and Treatment by Photodynamic and Photothermal Therapies

ABSTRACT

Breast cancer is characterized by the presence of a high degree of disordered cell proliferation, as the leading cause of death in women in the past years. The available treatments are generally aggressive and low effective. Therefore, it is required to develop new detection methods and nanotechnology can facilitate earlier diagnosis and efficient treatments. Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) can be coated with a thin layer of gold and functionalized, which enhances their biomedical applicability to develop a sensitive, rapid and accurate biosensor as cancer therapy agents. Photodynamic therapy (PDT) and photothermal therapy (PTT) have been used for cancer treatment, both applying photosensitive molecules, molecular oxygen and lasers. However, every step must be precisely controlled for efficient treatment. An appropriate wavelength of the laser stimulates the activation of the photosensitive molecule, leading to the formation of reactive oxygen species, such as single oxygen, which is toxic and causes cell death. In this context, the present thesis proposes the synthesis of SPIONs by the coprecipitation method, the coating with gold to obtain Au@SPIONs, the functionalization with the EGF protein for the production of Theranostic Nanoprobes and their application in PDT and PTT. The physical and hydrodynamic sizes were characterized, as well as the morphology, colloidal stability, crystal structure, chemical composition and magnetic properties. Subsequently, *in vitro* studies were carried out to evaluate the antitumor and toxicological activity of PDT and PTT in the cell lines MCF 10A and MDA-MB-468. The NTs showed internalization in the cytoplasm and nucleus of some cells of the cell line MDA-MB-468. After treatments with NTs, significant percentages of apoptosis were obtained in the MDA-MB-468 cell line and increasing ROS levels after PDT. In the study with the 3D culture of the MDA-MB-468 cell line, the NTs presented results that corroborated the initial 2D study, observing the penetration capacity of the NTs in the spheroids in different incubation time.

Keywords: Theranostic Nanoprobe. Nanopharmaceutical. Photodynamic Therapy. Photothermal Therapy. Diagnosis. Breast cancer.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do tamanho dos nanomateriais biológicos.	27
Figura 2: Representação da funcionalização das SPIONs com citrato de sódio.	33
Figura 3: Fluxograma Experimental.	40
Figura 4: Síntese das SPIONs pelo método de coprecipitação.	41
Figura 5: Síntese das Au@SPIONs.	42
Figura 6: Síntese das Nanossondas Teranósticas.	43
Figura 7: Distribuição de tamanho das SPIONs (a) sem e (b) com estabilizante.	55
Figura 8: Micrografia SEM-FEG de SPIONs (com estabilizante) e distribuição do diâmetro físico.	55
Figura 9: Micrografia SEM das SPIONs (a) sem e (b) com estabilizante.	56
Figura 10: Micrografia TEM das SPIONs e histograma de tamanho.	57
Figura 11: Caracterização por TEM das Au@SPIONs.	57
Figura 12: Análise de TEM e EDS das Au@SPIONs: a) micrografia de campo claro; b) micrografia de campo escuro; c) Espectro de EDS marcador "Spectrum 1"; d) Espectro de EDS marcador "Spectrum 2"; e) Micrografia com mapa EDS de distribuição de Fe e Au.	58
Figura 13: Caracterização por Espectroscopia UV-visível da curva de pH das SPIONs-8.	60
Figura 14: Caracterização por Espalhamento dinâmico da luz da curva de pH das SPIONs-8.	61
Figura 15: Difratoograma de Raios-X das SPIONs e a Tabela com as fichas de referência encontrados.	62
Figura 16: Caracterização por VSM das SPIONs sem e com o processo de estabilização com citrato de sódio.	63
Figura 17: Caracterização por VSM das SPIONs (a) e Au@SPIONs (b).	64
Figura 18: Espectros de FT-IR das SPIONs, Au@SPIONs, NTs e Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O.	65
Figura 19: Caracterização: (a) Espectro de absorção das Au@SPIONs na região do UV-Visível, (b) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das Au@SPIONs e (c) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das SPIONs.	66
Figura 20: Imagens fotográficas: (a) SPIONs evidenciando a coloração preta; (b) Au@SPIONs, de coloração vermelha; (c) sedimentação forçada das Au@SPIONs com aplicação de campo magnético externo.	67
Figura 21: Espectro UV-visível dos complexos Ce6-cisteamina.	68
Figura 22: Espectro de FT-IR do complexo Ce6-cisteamina.	68
Figura 23: Caracterização por espectroscopia UV-visível das NTs com o complexo Ce6-cisteamina.	69
Figura 24: Análise do tempo de incorporação da NTs nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, com tempos de incubação de 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min.	70
Figura 25: Micrografia da linhagem celular MDA-MB-468 e MCF10A para a análise de internalização das NTs. A coloração azul revela a fluorescência do DAPI	

ligado ao DNA no núcleo da célula e a vermelha é referente a fluorescência das NTs no citoplasma da célula. As colunas, da esquerda para a direita, indicam DAPI isolado e mesclagem, respectivamente. Uma imagem do corte da amostra de Nanossonda Teranóstica na linhagem MDA-MB-468 (100 pixel). Todos os experimentos foram realizados com um tempo de incubação de 2 h. As micrografias foram capturadas em um Microscópio Confocal, com barras de escala de 10 μm . 71

Figura 26: Análise de Viabilidade Celular (a) e Atividade Mitocondrial (b) na linhagem celular MDA-MB-468. 72

Figura 27: Análise de Viabilidade Celular (a) e Atividade Mitocondrial (b) na linhagem celular MCF 10A. 73

Figura 28: Montagem da câmara de irradiação para a realização dos experimentos de TFT nas linhagens células MDA-MB-468 e MCF10A. 74

Figura 29: Caracterização por Espectroscopia UV-Visível do LED utilizado na câmara de irradiação para a realização dos experimentos de TFT. 74

Figura 30: Análise de tipo de morte de SPIONs nas concentrações, após TFT:(a) 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (b) 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (c) 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; SPIONs+Ce6: (d) 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (e) 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (f) 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ com Ce6 (1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$); SPIONs+AuNPs, ambas nanopartículas na concentração de 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ sem Ce6 (1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) (g) e com Ce6 (1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) (h); Au@SPIONs: (i) 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; Ce6: (j) 1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (k) Controle positivo; (h) Controle negativo após PTT na linhagem celular MDA-MB-468. 76

Figura 31: Gráfico resumo das dispersões apresentadas na Figura 30. Análise de tipo de morte na linhagem celular MDA-MB-468 após TFT por Citometria de fluxo: (a) grupos controle e SPIONs; (b) grupos controle e SPIONs+Ce6 e (c) grupos controle, Au@SPIONs, SPIONs+AuNPs, SPIONs+AuNPs+Ce6 e Ce6. 77

Figura 32: Análise de viabilidade celular de NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, sendo os grupos (1) viabilidade celular da linhagem celular MDA-MB-468, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo; Grupo (2) viabilidade celular da linhagem celular MCF 10A, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo. 78

Figura 33: Análise do tipo de morte por TFT de NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, sendo os grupos (3) Tipo de morte celular na linhagem celular MDA-MB-468, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo; Grupo (4) Tipo de morte celular na linhagem celular MCF 10A, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo. 79

Figura 34: Análise do tipo de morte por TFD de NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, sendo os (5) Tipo de morte celular na linhagem celular MDA-MB-468, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo; Grupo (6) Tipo de morte celular na linhagem celular MCF 10A, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo. 80

Figura 35: Análise das espécies reativas de oxigênio (ERO's) na linhagem celular MDA-MB-468 após TFD, com NTs nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$. O controle 1 mostra os resultados (células tratadas apenas com luz), controle

2 (células apenas com NTs) e controle 3 (células sem nenhum tratamento).
81

Figura 36: Micrografia do modelo 3D (linhagem celular MDA-MB-468) para análise de internalização das NTs. A coloração azul revela a fluorescência do DAPI ligado ao DNA no núcleo da célula e a coloração vermelha é referente a fluorescência das NTs no citoplasma da célula. As colunas, da esquerda para a direita, indicam DAPI isolado, NTs e sobreposição das imagens respectivamente. Os experimentos foram realizados com um tempo de incubação de 30 min., 60 min., 120 min., 180 min. e 340 min. As micrografias foram capturadas em um Microscópio Confocal, com barras de escala de 100 μm .
82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 no Brasil.....	35
Tabela 2: Protocolo de medida do equipamento VSM.	47

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Reação de formação de Fe_3O_4 .	31
Equação 2: Cálculo da atividade mitocondrial em porcentagem.	51
Equação 3: Cálculo da viabilidade celular em porcentagem.	51
Equação 4: Cálculo da magnetização das nanopartículas.	64
Equação 5: Cálculo da susceptibilidade magnética das nanopartículas.	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IONPs	Nanopartículas de Óxido de Ferro, do Inglês “ <i>Iron Oxide Nanoparticles</i> ”
SPIONs	Nanopartículas Superparamagnética de Óxido de Ferro, do Inglês “ <i>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles</i> ”
TFD	Terapia fotodinâmica
TFT	Terapia Fototérmica
Au@SPIONs	Nanopartículas Superparamagnética de Óxido de Ferro recobertas com ouro, do Inglês “ <i>Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles coated with gold</i> ”
EGF	Proteína do fator de crescimento epidérmico, do inglês “ <i>Epidermal Growth Factor</i> ”
ISSO	Organização Internacional de Metrologia, do Inglês “ <i>International Organization for Standardization</i> ”
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos dos EUA, do Inglês “ <i>Food and Drug Administration</i> ”
AuNPs	Nanopartículas de ouro
NIR	Infravermelho próximo, do Inglês “ <i>Near Infrared</i> ”
IONPs@Au	Nanopartículas de óxido de ferro recobertas com ouro
SERS	Espectroscopia Raman amplificada por superfície, do Inglês “ <i>Surface Enhanced Raman Spectroscopy</i> ”
RM	Ressonância magnética
DLS	Espalhamento Dinâmico da Luz, do Inglês “ <i>Dynamic Light Scattering</i> ”
SEM-FEG	Microscópio Eletrônico de Varredura com Canhão de Emissão por Campo, do Inglês “ <i>Scanning Electron Microscopy- Field Emission Gun</i> ”
XRD	Difração de Raios-X, do Inglês “ <i>X-ray diffraction</i> ”
VSM	Magnetometria de Amostra Vibrante, do Inglês “ <i>Vibrating Sample Magnetometer</i> ”
FT-IR	Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier, do Inglês “ <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> ”

TEM	Microscópio Eletrônico de Transmissão, do Inglês <i>“Transmission Electron Microscopy”</i>
EDS	Espectroscopia de raios X por dispersão em energia, do inglês <i>“Energy-dispersive X-ray Spectroscopy”</i>
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico, do inglês <i>“Epidermal Growth Factor Receptor”</i>
ER	Receptor de Estrogênio, do inglês <i>“Estrogen Receptor”</i>
PR	Receptor de Progesterona, do inglês <i>“Progesterone Receptor”</i>
TNBC	Câncer De Mama Triplo Negativo, do inglês <i>“Triple-Negative Breast Cancer”</i>
RTK	Receptores Tirosina Quinase, do inglês <i>“Receptor Tyrosine Kinase”</i>
MBC	Câncer de mama metastático, do inglês <i>“Metastatic Breast Cancer”</i>
RM	Ressonância Magnética
PBS	Tampão Fosfato Salino, do inglês <i>‘Phosphate Saline Buffer’</i>
INCA	Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva
ERO's	Espécies Reativas de Oxigênio, do inglês <i>“Reactive Oxygen Species”</i>
LEDs	Diodos emissores de luz, do inglês <i>“Light emitting diodes”</i>

LISTA DE FÓRMULAS QUÍMICAS

Fe_3O_4	Magnetita
$\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Maguemita
$\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$	Hematita
$\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de ferro II
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Cloreto de ferro III
NH_4OH	Hidróxido de amônio
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Citrato de sódio dihidratado
HAuCl_4	Cloreto de ouro
$\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$	Cloridrato de hidroxilamina
NaO_2CCH_3	Acetato de sódio
$\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,10-fenantrolina monohidratada
HNO_3	Ácido nítrico
CO_2	Dióxido de carbono
Ce6	Clorina e6

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	22
1.1	OBJETIVOS	26
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	NANOTECNOLOGIA.....	27
2.2	NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO	28
2.3	SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO PELO MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO QUÍMICA	30
2.4	ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS.....	31
2.5	NANOPARTÍCULAS <i>CORE-SHELL</i>	33
2.6	CÂNCER DE MAMA.....	35
2.7	TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA.....	37
3	MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1	SÍNTESE DAS SPIONS.....	41
3.2	RECOBRIMENTO DAS SPIONS COM OURO – <i>CORE-SHELL</i>	42
3.3	MODIFICAÇÃO QUÍMICA VIA CARBODIIMIDA	42
3.4	NANOSSONDA TERANÓSTICA.....	43
3.5	CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS	44
3.5.1	Análise de Espectroscopia de UV-Visível	44
3.5.2	Análise de Espalhamento Dinâmico da Luz	44
3.5.3	Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura	45
3.5.4	Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão	46
3.5.5	Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier	46
3.5.6	Análise de Difração de Raios-X	46
3.5.7	Análise por Magnetômetro de Amostra Vibrante	47
3.5.8	Análise de pH	48
3.5.9	Quantificação de ferro	48
3.6	CULTURA DE CÉLULAS 2D	48
3.6.1	MCF 10A	48

3.6.2	MDA-MB-468.....	49
3.7	ANÁLISE DO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO DAS NANOSSONDAS TERANÓSTICAS.....	49
3.8	ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL.....	50
3.9	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS SPIONS E AU@SPIONS.....	51
3.10	ENSAIO DE TERAPIA FOTODINÂMICA EM CULTURA CELULAR.....	51
3.11	ENSAIO DE TERAPIA FOTOTÉRMICA EM CULTURA CELULAR	52
3.12	DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR – ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO.....	52
3.13	QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO	53
3.14	ESTUDO PRELIMINAR EM CULTURA CELULAR 3D.....	53
4	RESULTADOS	54
4.1	CARACTERIZAÇÃO DAS SPIONS E AU@SPIONS	54
4.2	CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS CE6-CISTEAMINA E NANOSSONDA TERANÓSTICA.....	67
4.3	TESTE DE CITOTOXICIDADE.....	72
4.4	MONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA CÂMARA DE IRRADIAÇÃO PARA TFT	73
4.5	DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE	75
4.6	ESTUDO INICIAL COM MODELO 3D DA LINHAGEM CELULAR MDA-MB-468	81
5	DISCUSSÃO	83
6	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICE A – ARTIGO “SYNTHESIS OF IRON OXIDE NANOPARTICLES STABILIZED WITH SODIUM CITRATE AND TMAOH” PUBLICADO NO PERÍODO.....	107
	APÊNDICE B – ARTIGO “GOLD-COATED SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED TO EGF AND CE6 COMPLEXES FOR BREAST CANCER DIAGNOSES AND THERAPY” PUBLICADO NO PERÍODO.....	108
	APÊNDICE C – ARTIGO “SPECIFIC NANOMARKERS FLUORESCENCE: <i>IN VITRO</i> ANALYSIS FOR EGFR OVEREXPRESSED CELLS IN TRIPLE-	

NEGATIVE BREAST CANCER AND MALIGNANT GLIOBLASTOMA” PUBLICADO NO PERÍODO.....	109
APÊNDICE D – ARTIGO “THE COMPARISON BETWEEN LABEL-FREE AND NON-CROSS-LINKING METHODS WITH GOLD NANOPARTICLES FOR COLORIMETRIC DETECTION OF PARACOCCIDIODES BRASILIENSIS” PUBLICADO NO PERÍODO.....	110
APÊNDICE E – CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO.....	111
APÊNDICE F – RESUMO APRESENTADO EM CONFERÊNCIA INTERNACIONAL	112
APÊNDICE G – RESUMO APRESENTADO EM CONFERÊNCIA NACIONAL.	118
APÊNDICE H – PREMIAÇÕES.....	125

1 INTRODUÇÃO

Inúmeros estudos têm como tema “câncer” com múltiplas abordagens, como por exemplo, o diagnóstico, o tratamento, ou no entendimento profundo das causas de sua origem. Em uma sucinta descrição, o câncer é uma doença decorrente da presença de mutações celulares que com proliferação desenfreada, causa destruição de estruturas adjacentes e metástase (ROSÁRIO *et al.*, 2018; EYVAZZADEH *et al.*, 2017). Em 2018, os dados epidemiológicos mostram que o câncer foi a segunda principal causa de morte, atingindo 10 milhões de mortes em todo o mundo, conforme a Organização Mundial da Saúde (MUEHLBERGER *et al.*, 2019). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é o órgão auxiliar do Ministério da Saúde, que divulga os dados estatísticos e a projeção de probabilidade de novos casos de câncer dentro do cenário brasileiro. Segundo este instituto, o câncer corresponde a um problema de saúde pública mundial, e enquadra-se entre as quatro principais causas de morte em pacientes com idades inferiores a 70 anos (INCA, 2019). Um dado importante é o aumento progressivo da taxa de incidência deste tipo de câncer nos últimos anos (HADI *et al.*, 2019), tendo potencial de metástase cerebral em diagnósticos tardios (OEHRlich *et al.*, 2017). As taxas de mortalidade para o câncer de mama em países desenvolvidos estão em declínio, devido ao diagnóstico precoce por mamografia e da melhora em seu tratamento. Entretanto em países em desenvolvimento seu diagnóstico é obtido em estágios avançados, devido à falta de detecção e tratamento precoce (VIERA *et al.*, 2017).

A expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) serve como um indicador na avaliação dos efeitos de drogas antitumorais para terapias direcionadas do câncer (ZHANG *et al.*, 2018). O EGFR corresponde a um receptor transmembranar de tirosina quinase, que tem importante papel na carcinogênese como sobrevivência celular, apoptose celular, metástase de tumor e angiogênese. Dentre os tumores sólidos que superexpressam o EGFR estão o câncer de cabeça, pescoço, pulmão e mama (LI *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2018), cólon, rim, próstata (LI *et al.*, 2018), câncer de bexiga (LI *et al.*, 2018; HUSSAIN *et al.*, 2018) e pâncreas (ZHANG *et al.*, 2018; LE, 2018).

Atualmente, o tratamento de câncer de mama inclui cirurgia, radioterapia, quimioterapia, terapia hormonal ou combinação de terapias (HADI *et al.*, 2019). No diagnóstico, a identificação dos biomarcadores de câncer é extremamente importante

para a terapia clínica. Os métodos mais conhecidos de detecção do câncer são ensaio imunoenzimático, o uso de ressonância plasmônica de superfície (*Surface Plasmon Resonance*, SPR) em soluções coloidais, imunensaio eletroquímico e espectrometria de massa. Entretanto, a maioria dos métodos de análises convencionais não detectam biomarcadores em baixa concentração, além de possuírem elevado custo e tempo de análise (ZHANG; MISRA, 2018).

Neste contexto, a nanotecnologia tem emergido como um novo campo de pesquisa, com foco no desenvolvimento e aplicação de nanomateriais para melhora de diagnóstico e terapia de câncer, principalmente com nanopartículas de óxido de ferro (*Iron Oxide Nanoparticles*, IONPs) (EYVAZZADEH *et al.*, 2017). Esses nanomateriais magnéticos têm contribuído significativamente nas áreas de diagnóstico clínico, terapias, na entrega de fármacos, separação magnética de células marcadas, drogas terapêuticas, entrega de genes e radionuclídeos, métodos de radiofrequências em catabolismo de tumores por meio da hipertermia, como agentes de contraste em ressonância magnética (RM) e terapia fotodinâmica (TFD) (BAJAJ, 2010; HUANG; KELLER, 2015; AGHAZADEH, 2017; JURADO PALOMARES, 2019; EL-BOUBBOU, 2018; EYVAZZADEH *et al.*, 2017; PEREIRA, 2018; NI *et al.*, 2018).

Os principais métodos de síntese de nanopartículas magnéticas subdividem-se em decomposição térmica, hidrotérmicas, solvotérmicas e coprecipitação química (AGHAZADEH, 2017). Entre eles, o método de coprecipitação é classificado como simples, fácil e rápido de se desenvolver, além de possibilitar maior produção de IONPs (PEREIRA, 2018). Nesta metodologia as IONPs são formadas por meio de soluções aquosas férricas (Fe^{3+}) e ferrosas (Fe^{2+}) como precursoras, as quais são adicionados agentes alcalinos e durante todo processo de síntese é controlado a temperatura e o pH. O mecanismo de reação na coprecipitação ainda é objeto de estudo, devido à formação de óxidos intermediários que dificulta a reprodutibilidade das sínteses, entretanto sabe-se que as fases principais formadas são magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) (LAGROW *et al.*, 2019).

As IONPs podem apresentar natureza superparamagnéticas (*Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles*, SPIONs), pois respondem à um campo magnético externo e na ausência deste campo, seu estado não-magnético é recuperado (RAHMAN *et al.*, 2015; UNNI *et al.*, 2017). Suas aplicações biomédicas têm crescido consideravelmente ao longo dos anos, devido à grande diversidade de estruturas e propriedades (PEREIRA, 2018; SOARES, 2018; PON-ON *et al.*, 2018). A

metabolização das SPIONs ocorre no fígado, podendo se acumular em outros órgãos do sistema reticuloendotelial. Como resultado, pesquisas estão sendo feitas para determinar os melhores métodos para liberação de fármacos e assim reduzir a toxicidade, como exemplo, mudanças de temperatura, pH e enzimas de tumores (LI, 2017).

As SPIONs combinam as capacidades terapêuticas e de diagnóstico em uma única formulação, sendo utilizadas como agentes teranósticos de diversos tipos de câncer (LI, 2017; FERJAOUI *et al.*, 2019). Sua biocompatibilidade pode ser melhorada com um revestimento de ouro (*core-shell*) para uso como agentes de contrastes e terapias fototérmicas (TFT) de tumor (CHATTERJEE *et al.*, 2014; AZHDARZADEH *et al.*, 2016; EYVAZZADEH *et al.*, 2017).

A TFD tem sido amplamente empregada em pesquisas para tratamento de doenças como infecção viral, degeneração macular, psoríase (NI *et al.*, 2018) e tumores malignos (LI, 2017; NI *et al.*, 2018). Atua como um tratamento alternativo e não invasivo, mas necessita de uma molécula fotossensível, uma fonte de luz e oxigênio molecular (BOURAMTANE *et al.*, 2019; DE OLIVEIRA *et al.*, 2015; AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019). Na ausência de luz, os fotossensibilizadores (FS) não apresentam característica tóxica para as células, mas quando iluminados em comprimentos de onda específicos geram espécies reativas de oxigênio (ERO's) que destroem as células (AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019).

Esses FS quando irradiados passam do estado fundamental para o singleto, que pode ser por mecanismo do tipo I com fluorescência ou como mecanismo tipo II com o cruzamento intersistema e a formação do estado tripleto. No Tipo I, ocorre a geração de radicais livres que podem reagir com o oxigênio no estado fundamental formando as ERO's. No Tipo II, o FS transfere a energia para o oxigênio, dando origem ao oxigênio singleto que é extremamente reativo (BOURAMTANE *et al.*, 2019). A clorina e6 (Ce6) é um FS de segunda geração e de uso clínico, possui elevada sensibilidade, rápida eliminação do organismo, podendo ser irradiado com laser de 660–670 nm (AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019).

A TFT é uma modalidade de tratamento de hipertermia que utiliza agentes fototérmicos para produção de calor no local irradiado, seguido de morte celular. As terapias TFD/TFT quando combinadas, melhoraram a eficácia do tratamento, além de poderem diminuir significativamente a invasividade e a toxicidade sistêmica (XU *et al.*, 2019; WAN *et al.*, 2018). As nanopartículas de metais nobres, como as nanopartículas

com ouro têm demonstrado propriedades ópticas interessantes na TFD para vários tipos de câncer. Nessa terapia, uma grande quantidade de calor localizado é gerada por fotoexcitação dos nanomateriais em suas respectivas bandas de ressonância plasmônica de superfície localizada (GHAZNAVI *et al.*, 2017; EYVAZZADEH *et al.*, 2017; ZHANG; MISRA, 2018). Ambas as terapias apresentam vantagens, como natureza não invasiva, seletividade relativamente alta para o tecido tumoral e baixa toxicidade para os tecidos normais, custo-efetividade, tratamentos tumorais altamente localizados e específicos e maiores taxas de cura para alguns tumores (WAN *et al.*, 2018; AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019).

Neste contexto, a presente tese propõe a síntese e caracterização de nanopartículas de óxido de ferro pelo método de coprecipitação química, posteriormente estabiliza-las com citrato de sódio e recobri-las com uma camada de ouro. As Au@SPIONs formadas foram funcionalizadas com a proteína EGF e o FS (Ce6) para produção das Nanossondas Teranósticas (NTs). As SPIONs, Au@SPIONs e as Nanossondas Teranósticas foram estudadas *in vitro* nas linhagens celulares, normal (MCF 10A) e tumoral (MDA-MB-468) para análise de citotoxicidade. As NTs foram analisadas por Espectroscopia de Fluorescência, Microscopia de Fluorescência Confocal. As análises de citotoxicidade, TFD e TFT foram desenvolvidas para formação de um novo método de detecção e tratamento do câncer de mama. Estudos iniciais com cultura 3D com a linhagem celular MDA-MB-468 foram desenvolvidos com o objetivo de comparar os resultados de internalização das NTs aos experimentos bidimensionais *in vitro*.

1.1 OBJETIVOS

Sintetizar e caracterizar nanopartículas de óxidos de ferro recobertas com ouro e funcionalizar com o FS (Ce6) e a proteína EGF para estudo *in vitro* na linhagem celular MCF 10A e MDA-MB-468. Os objetivos específicos foram:

Sintetizar as SPIONs e caracterizar o diâmetro hidrodinâmico e o Potencial Zeta por DLS, a morfologia e o diâmetro físico por SEM-FEG e TEM, a estrutura cristalina por XRD, a composição química por FT-IR e as propriedades magnéticas por VSM.

- a) Estudo de estabilidade das SPIONs em função do pH do meio para estudo do recobrimento com ouro e realização da modificação química via carbodiamida.
- b) Recobrir as SPIONs com cloreto de ouro – Au@SPIONs e caracterizá-las pelas técnicas de Espectroscopia UV-visível, DLS, XRD, FT-IR, VSM e TEM.
- c) Funcionalizar as Au@SPIONs com o complexo EGF- α -ácido Lipóico e Ce6-cisteamina para obtenção das NTs e caracterizá-las pelas técnicas de Espectroscopia UV-visível e FT-IR.
- d) Avaliar, *in vitro*, a citotoxicidade das nanopartículas nas linhagens celulares MCF 10A e MDA-MB-468 e verificar sua eficiência no uso da terapia fotodinâmica, terapia fototérmica e da combinação dessas terapias na ausência e presença de radiação.
- e) Avaliar o tempo de incorporação e a quantificação das NTs por citometria de fluxo, confirmar a internalização das NTs por microscopia de Fluorescência Confocal para as linhagens celulares MCF 10A e MDA-MB-468.
- f) Determinar o tipo de morte celular das linhagens celulares MCF 10A e MDA-MB-468.
- g) Comparar os resultados de internalização das NTs em experimentos *in vitro*, 2D e 3D.

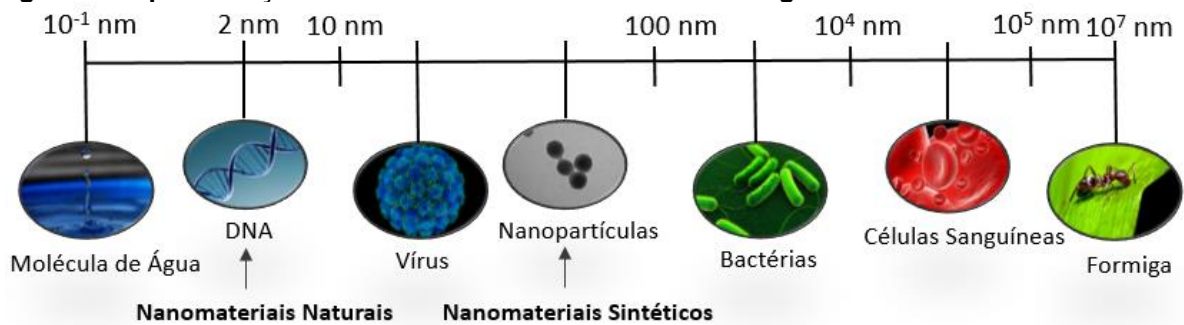
2 REVISÃO DE LITERATURA

Questões importantes abordadas na tese são descritas neste capítulo de revisão de literatura, por meio de uma estrutura conceitual que enfatiza a importância do desenvolvimento de novos métodos de tratamento do câncer de mama com o auxílio da nanotecnologia que sejam eficazes e menos invasivos.

2.1 NANOTECNOLOGIA

A Organização Internacional de Normalização (ISO) define nanopartícula como um objeto com as três dimensões na nanoescala. Sendo assim, as nanopartículas são arranjos de estruturas atômicas na ordem de nanômetros (nm; $1 \text{ nm} = 10^{-9} \text{ m}$), que devido ao seu tamanho, possuem características únicas, como elevada área superficial por unidade de volume e capacidade de exibirem efeitos quânticos (SHABATINA *et al.*, 2020; BEGUM *et al.*, 2020). Na Figura 1 é mostrado uma representação de estruturas na escala nanométrica.

Figura 1: Representação do tamanho dos nanomateriais biológicos.



Fonte: Autor.

Os nanomateriais podem ser elementos naturais automontados em nanoestrutura, nanomateriais naturais, como estruturas celulares (proteínas, enzimas, DNA humano) ou podem ser obtidos de forma sintética, denominados nanomateriais sintéticos, como exemplo, o dióxido de titânio que em escala macro possui uma cor branca e é utilizado na equalização de colorações, entretanto quando na nanoescala torna-se transparente e é muito utilizado em revestimentos e protetores solares (BERTI; PORTO, 2016).

A análise toxicológica dos nanomateriais pode ser realizada *in vivo*, *in vitro* ou *in sílico*. Os Métodos *in vitro* e *in sílico* são fontes indispensáveis para ajudar na avaliação de risco e segurança de nanomateriais. Entretanto, atualmente existem métodos alternativos de teste que podem ser otimizados para um nanomaterial específico e assim ajudar na determinação da segurança de ingredientes (BERTI; PORTO, 2016).

Os nanomateriais podem ter propriedades químicas, físicas e biológicas que diferem daqueles em escalas maiores. As informações de suas características como, tamanho, forma, estrutura cristalina, revestimento de superfície, reatividade de superfície são importantes para determinação de seu potencial de toxicidade (BERTI; PORTO, 2016). As nanopartículas são utilizadas em uma variedade de produtos, incluindo alguns já aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA), dos Estados Unidos, como o Ferumoxitol, autorizado em 2009 e usado em casos de deficiência de ferro, o Resovist (Bayer Schering Pharma AG) é composto injetável de IONPs revestidos com carboxidextrana, sendo utilizado como agente de contraste em imagens de ressonância magnética para lesões de fígado e baço, autorizada pela FDA em 1996, e em 2001 pela Europa e Feridex (AMAG Pharma) (KAMMARI *et al.*, 2017).

2.2 NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO

A aplicação da nanotecnologia na área da saúde tem melhorado os sistemas convencionais de entrega de medicamentos. A morfologia e o diâmetro das nanopartículas são parâmetros significativos para sua produção e aplicação, pois uma elevada área superficial aumenta a reatividade e entrega de íons, enquanto seu desempenho depende de sua composição e solubilidade. Seu processo de síntese pode ser determinado pelo método "top-down", que envolve a quebra do material por desgaste e resulta em uma ampla distribuição granulométrica e morfológica, ou pelo método "bottom-up", que envolve a combinação de átomos ou moléculas para formação de nanopartículas maiores, sendo este método utilizado para produzir nanopartículas mais homogêneas e com uma distribuição uniforme de tamanho e forma (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Nos últimos anos as IONPs têm sido amplamente utilizadas na área biomédica para aplicações teranósticas, principalmente em estudos com hipertermia, como

carreador de drogas para tratamento de câncer, mas também como agentes de contraste para ressonância magnética, biossensores, separação de biomoléculas, purificação de proteína, imunoenensaio, marcadores celulares, reparo tecidual, entrega direcionada de anticorpos e ácidos nucleicos, etc (ZHU *et al.*, 2018; DADFAR *et al.*, 2019; FULLER *et al.*, 2019; AJINKYA *et al.*, 2020; BRENNAN *et al.*, 2020; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; WU *et al.*, 2021; CANAPARO *et al.*, 2020; CREȚU *et al.*, 2021).

As IONPs formadas principalmente por Fe_3O_4 , $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ ou hematita ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$) tem emergido em decorrência de suas propriedades únicas, como elevada magnetização e relação área-volume, bem como baixa citotoxicidade (CREȚU *et al.*, 2021; WU *et al.*, 2021; CANAPARO *et al.*, 2020; ANSARI *et al.*, 2022). As IONPs podem ser direcionadas para uma região específica, por meio da aplicação de um campo magnético externo, à medida que circulam pela corrente sanguínea (AMATYA *et al.*, 2021).

As propriedades físicas e químicas das nanopartículas são diretamente dependentes de sua forma, tamanho, estrutura cristalina, composição química e dispersibilidade (SHABATINA *et al.*, 2020; AJINKYA *et al.*, 2020), que influenciam a performance de tais materiais em suas aplicações (ZHU *et al.*, 2018). Além disso, as IONPs também podem apresentar propriedades magnéticas específicas, como baixa temperatura de Curie (também denominado Ponto de Curie), alta suscetibilidade magnética e superparamagnetismo (SHABATINA *et al.*, 2020; AJINKYA *et al.*, 2020). As IONPs superparamagnéticas (SPIONs) apresentam momentos magnéticos apenas na presença de um campo magnético externo (DADFAR *et al.*, 2019; SHABATINA *et al.*, 2020).

As nanopartículas de Fe_3O_4 são superparamagnéticas, com diâmetros inferiores a 20 nm, seu comportamento paramagnético ou superparamagnético é aumentado por meio da redução no tamanho. Consequentemente, observa-se um decréscimo do comportamento ferromagnético, devido à redução do estado de valência do ferro (AJINKYA *et al.*, 2020). As partículas menores que o diâmetro crítico podem apresentar um único domínio, com magnetização e orientação uniforme de um único spin sobre todo o volume de partícula (MOHAPATRA e LIU, 2018; SHABATINA *et al.*, 2020). Na presença de flutuações térmicas, o momento magnético inverte aleatoriamente a direção, resultando em uma magnetização média de zero partículas superparamagnéticas. Entretanto, quando há a aplicação de um campo magnético,

essas partículas se comportam como paramagnéticas mesmo em temperaturas inferiores ao Ponto de Curie ou Ponto Néel (SHABATINA *et al.*, 2020).

Inúmeros trabalhos têm avaliado as IONPs em ensaios pré-clínicos e clínicos, e várias formulações contendo estas nanopartículas foram aprovadas pela FDA, como exemplo, o Ferumoxtran, Ferucarbotran (Ferrixan), Ferumoxide, Ferumoxytol e Feruglose Ferumoxsil (DADFAR *et al.*, 2019; ISRAEL *et al.*, 2020; DULÍNSKA-LITEWKA *et al.*, 2019; DU *et al.*, 2020; JIAO *et al.* 2022). As IONPs tendem ao processo de oxidação, o que limita suas aplicações biomédicas. Entretanto, o uso de revestimentos poliméricos para evitar processos de oxidação ou interações com meios externos sem prejudicar suas propriedades magnéticas pode ser uma opção. SPIONs, como γ -Fe₂O₃ ou Fe₃O₄ são amplamente utilizadas para fins biomédicos, devido ao superparamagnetismo, biocompatibilidade, baixo custo, método de preparação simples e baixa toxicidade (SHABATINA *et al.*, 2020).

As fases Fe₃O₄ e γ -Fe₂O₃ são óxidos ferromagnéticos com estruturas espinélicas semelhantes. O Fe₃O₄ possui estrutura espinélica invertida com uma rede cúbica de face centrada e parâmetro de rede (a) igual a 0,839 nm. Sua célula é composta por 32 íons de oxigênio (O²⁻) posicionados ao longo da direção cristalina (111), formando uma camada octaédrica e uma camada mista tetraédrica/octaédrica. O Fe₃O₄ possui íons Fe²⁺ e Fe³⁺ e sua estrutura pode ser escrita como (Fe³⁺)_A(Fe²⁺Fe³⁺)_BO₄. O γ -Fe₂O₃ constitui a forma oxidada do Fe₃O₄, possui célula unitária composta por 32 O²⁻ que forma uma estrutura cúbica fechada, com a = 0,8347 nm em virtude da formação das vacâncias catiônicas e do tamanho menor dos íons Fe³⁺ em comparação com os íons Fe²⁺. O γ -Fe₂O₃ possui íons de ferro trivalentes e sua estrutura pode ser escrita como 0,75 (Fe³⁺)_A(Fe³⁺_{5/3}V_{1/3})_BO₄, quando V representa a vacância Fe²⁺ localizada na posição octaédrica (SHABATINA *et al.*, 2020).

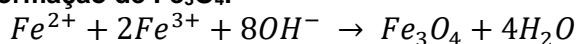
2.3 SÍNTESE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO PELO MÉTODO DE COPRECIPITAÇÃO QUÍMICA

As IONPs podem ser preparadas por processos físicos, químicos e/ou biológicos. O método físico se caracteriza pela facilidade de desenvolvimento, entretanto, não se consegue controlar a morfologia e o diâmetro. O método químico corresponde a um processo mais simples e eficiente, no qual as nanopartículas

podem apresentar alterações morfológicas que serão dependentes dos parâmetros de síntese, podendo ser porosas ou não porosas, em formato de esferas, plaquetas, bastões, nanotubos, nanobastões, dentre outras. No método biológico, seu processo é menos dispendioso, com boa reprodutibilidade e elevado rendimento, porém é um processo laborioso e demorado (CREȚU *et al.*, 2021).

Diferentes métodos de síntese de nanopartículas magnéticas têm sido estudados, como coprecipitação, rota hidrotérmica, decomposição térmica, microemulsão, deposição eletroquímica, pirólise a laser, solvotérmicos, sonoquímicos, deposição química de vapor, assistido por micro-ondas e pirólise de aerossóis (ZHU *et al.*, 2018). A coprecipitação química (reação apresentada abaixo) destaca-se pela rota de síntese mais simples e usual para produção de SPIONs com grupos funcionais -OH na superfície, que são indispensáveis no tratamento do câncer.

Equação 1: Reação de formação de Fe₃O₄.



A essência dessa metodologia consiste em obter soluções coloidais por meio de precursores de sais férricos e ferrosos na razão molar de 2:1, com adição de agente precipitante, por exemplo, solução de amoníacos, hidróxidos e carbonato de cálcio em temperatura ambiente ou com aquecimento. Como neste método ocorre a oxidação de Fe₃O₄ à γ-Fe₂O₃, para se obter predominantemente magnetita, toda reação deve ocorrer na presença de gases inertes como argônio ou nitrogênio (SHABATINA *et al.*, 2020; HEDAYATNASAB *et al.*, 2020; RADOŃ *et al.*, 2017; HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; CREȚU *et al.*, 2021). Como principal vantagem, este método proporciona um maior rendimento quando comparado com outras metodologias. Além disso, o tamanho, a morfologia e a composição das IONPs dependem principalmente do tipo de solução salina utilizado, temperatura de reação, pH e força iônica do meio (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

2.4 ESTABILIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

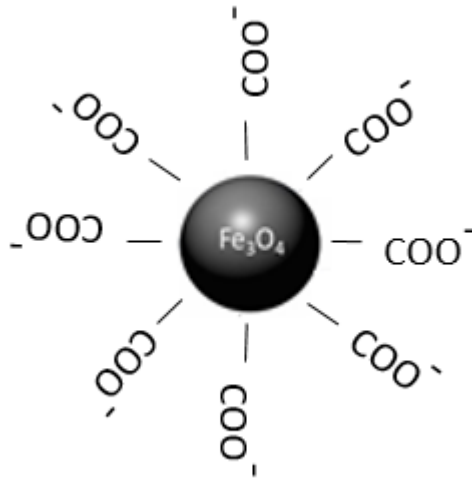
A aplicação de SPIONs no campo biomédico é determinada por três fatores: morfologia, tamanho e propriedades de superfície. Durante o processo de síntese, vários fatores como a presença de surfactantes, razão Fe²⁺/Fe³⁺, tipo de sais, controle

de pH, força iônica, tipo de base (NaOH, Na₂CO₃, NH₄OH), taxa de agitação, fluxo de entrada de gás nitrogênio/argônio e temperatura ou tempo de reação, podem afetar a morfologia e assim alterar o tempo de circulação sanguínea, absorção celular e biodistribuição (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020; CREȚU *et al.*, 2021; AMATYA *et al.*, 2021). Como as IONPs apresentam razão área/volume superficial elevada, magnetização, forças de Van der Waals e alta energia superficial, estas tendem a se agregar. Sendo assim, a estabilização pode ser feita reagindo-as com tensoativos aniônicos, como agentes dispersantes e revestidos com materiais inorgânicos (sílica, ouro ou gadolínio) ou estabilizadores de polímeros que são biocompatíveis (CREȚU *et al.*, 2021).

A modificação com citrato na superfície das SPIONs tem sido amplamente estudada devido à sua simplicidade, por melhorar a estabilidade das nanopartículas quando em soluções aquosas, por proporcionar uma magnetização ideal e uma citocompatibilidade (ELAHI, RIZWAN, 2021; DA SILVA ASSIS *et al.*, 2019). O citrato possui grupos carboxilatos (RCOO⁻) que podem se adsorver na superfície das nanopartículas e auxiliar na funcionalização de biomoléculas ou polímeros. Entretanto, soluções aquosas de ácido cítrico e sais de citrato podem apresentar processos de dissociação e hidrólise quando se altera concentrações de solutos, pH e temperatura (KRUKOWSKI; KARASIEWICZ; KOLODZIEJSKI, 2017). De acordo com o valor de pH as SPIONs podem se desestabilizarem ocasionando um aumento no diâmetro da partícula.

As SPIONs funcionalizadas com citrato tem sido empregada para inúmeras aplicações *in vitro* e *in vivo*, como exemplo, em estudos para aplicação em terapia imunológica controlada magneticamente, no qual é descrito que há uma citocompatibilidade com célula T e estabilidade coloidal no sangue. Também é possível obter um biossensor eficiente por meio da funcionalização com grupo amino na superfície das SPIONs (ELAHI, RIZWAN, 2021). Na Figura 2 é apresentado uma ilustração das SPIONs, após estabilizar com moléculas de citrato de sódio.

Figura 2: Representação da funcionalização das SPIONs com citrato de sódio.



Fonte: Autor.

2.5 NANOPARTÍCULAS CORE-SHELL

As IONPs como sintetizadas apresentam algumas limitações, como a rápida aglomeração, oxidação no ambiente fisiológico de tumores, devido ao alto valor da razão volume/área superficial, reatividade química e elevada energia superficial, que resulta em perda de magnetismo. Estruturas *core-shell* (núcleo encapsulado por uma película) tendem a proporcionar uma superfície inerte, que facilita processos de funcionalização da partícula, com o objetivo de melhorar a estabilidade e a biocompatibilidade dessas soluções (ZHU *et al.*, 2018; DHEYAB *et al.*, 2020).

O ouro é um metal precioso, comumente utilizado em revestimentos de superfícies. O método direto pode ser aplicado para se revestir IONPs, que pode ser realizado por duas vias, com solução aquosa ou orgânica. Quando em solução aquosa, a casca de ouro é formada por meio da redução de Au^{3+} com o auxílio de agentes redutores, e os mais utilizados são citrato de sódio e borohidreto de sódio. Na via de síntese orgânica, geralmente os agentes niveladores de solução são o ácido oleico e a oleilamina. No método indireto, é formada uma camada de “cola” entre o núcleo de IONPs e a casca de ouro. Essa camada tem como característica aumentar a estabilidade e, por apresentar sítios para a ligação química, tende a promover a fixação de sementes de ouro para a formação de uma casca. Dentre os materiais mais empregados como camada de “cola”, destacam-se os polímeros, sílica e carbono (ZHU *et al.*, 2018).

As nanopartículas de ouro (AuNPs) têm recebido uma atenção considerável nas últimas décadas, tendo sido comumente aplicada em TFT. Quando irradiadas por laser, AuNPs podem converter a energia da luz em calor, resultando no aumento de temperatura da solução. Sendo assim, o direcionamento preferencial destas nanopartículas para tumores, seguido de irradiação por meio de um laser, que é uma estratégia seletiva para ocasionar ablação térmica de células tumorais (MIRRAHIMI *et al.*, 2019; FARASHAHI *et al.*, 2019; ABED *et al.*, 2019). Entretanto, seu uso clínico se tornou limitado, devido ao desconhecimento de sua toxicidade quando utilizadas na TFT e por apresentarem comprimento de onda relativamente curto de absorção (~520 nm) quando em formato esférico (YANG *et al.*, 2017; ABED *et al.*, 2019). Desse modo, a profundidade de penetração do laser torna-se limitada em virtude da forte absorção da radiação por biomoléculas dos tecidos biológicos, como exemplo, hemoglobina e melanina. O menor valor do coeficiente de absorção destes tecidos na região do infravermelho próximo (*Near Infrared*, NIR) (700 – 1100 nm) favorece o desenvolvimento de terapias e é considerada como uma “janela terapêutica óptica”. Sendo assim, novos nanomateriais com outras estruturas de AuNPs, como nanoshell, nanobastões e nanocages têm sido investigados com o objetivo de solucionar essa questão (ABED *et al.*, 2019).

Nanopartículas *core-shell*, também denominadas de nanopartículas híbridas, com núcleo de ferro e casca de ouro (Au@SPIONs) são multifuncionais, que aprimoram as propriedades químicas, físicas e ópticas de ambos os materiais (KUMARI; SHARMA; SAHI, 2021). Estas nanopartículas são promissoras para hipertermia magnética, devido às propriedades magnéticas do ferro, que pode causar ablação térmica nas células cancerígenas, e pela presença do recobrimento de ouro, que protege o ferro de processos de oxidação. Além disso, a casca de ouro tende a reduzir as interações magnéticas entre partículas, resultando em uma melhor dispersão em meio biológico (SANAD *et al.*, 2021). Podem ser utilizadas na detecção de moléculas via espalhamento Raman intensificado por superfície (SERS) (SCHWAMINGER; BAUER; FRAGA-GARCÍA, 2021), na TFT e como agentes de contrastes de imagem óptica (LOZANO-PEDRAZA *et al.*, 2021; KUMARI; SHARMA; SAHI, 2021; MIRRAHIMI *et al.*, 2019; GHAZNAVI *et al.*, 2018; ABED *et al.*, 2019; BRENNAN *et al.*, 2020). Também podem ser direcionadas para a posição desejada sob o campo magnético externo (ABED *et al.*, 2019).

2.6 CÂNCER DE MAMA

O câncer é uma das principais causas de morte no mundo, logo almeja-se um diagnóstico precoce e um tratamento em tempo hábil, que resultará em uma maior probabilidade de sobrevida e menor morbidade (MOKHOSI *et al.*, 2022). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA) é o órgão auxiliar do Ministério da Saúde, que divulga os dados estatísticos e a projeção de probabilidade de novos casos dentro do cenário brasileiro (exceto para câncer de pele não melanoma), como mostrado na Tabela 1 (INCA, 2019).

Tabela 1: Distribuição dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2020 no Brasil.

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: Inca, (2019).

Nesta distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no Brasil, observa-se que o câncer de mama é o mais comum entre mulheres, estimando-se 66.280 novos casos de câncer de mama, para cada ano do triênio 2020-2022 (INCA, 2019). Sendo um câncer metastático (do inglês, *Metastatic Breast Cancer*, MBC), este se espalha para outras partes do corpo como, ossos, fígado, pulmão e cérebro, o que dificulta seu tratamento. Com a detecção precoce da doença, há uma alta porcentagem de sobrevida. Entre os fatores de risco relacionados à doença destaca-se o envelhecimento, fatores reprodutivos, histórico familiar, estilo de vida, idade, etnia, desequilíbrio hormonal e tabagismo. O agravamento é relacionado ao número de locais metastáticos, tipos de mutação e a biologia subjacente do tumor, como grau e tamanho do tumor primário (AL-MAHMOOD *et al.*, 2018; INCA, 2019; SUN *et al.*, 2017).

O câncer de mama pode ser classificado em subgrupos moleculares que possuem diferentes expressões de receptores do câncer, como receptor de

crescimento epitelial humano tipo 2 (HER-2), luminal A, luminal B, claudin-low e basal-like, que possuem características de metástase para órgãos distantes (AL-MAHMOOD *et al.*, 2018). Entretanto, os fatores prognósticos padrões são receptores de estrogênio (ER), receptor de progesterona (PR), HER-2 e status de proliferação (Ki-67). No câncer de mama triplo negativo (do inglês, *triple-negative breast cancer*, TNBC), doença heterogênea e agressiva, a expressão de ER, PR e HER-2 é ausente, sendo, responsável por 20% de todos os casos de câncer de mama, com recorrência de 30-40% e elevado potencial de metástase no cérebro (SUN *et al.*, 2017; DOS SANTOS JESUS *et al.*, 2022; AL-MAHMOOD *et al.*, 2018; LEV, 2020; HSU; HUNG, 2016; SIRKISOON *et al.*, 2016).

O TNBC possui superexpressão do Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR), o que acelera o crescimento celular e tecidual pela regulação da proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência das células. O TNBC possui elevados índices mitóticos, altas taxas de metástase e mau prognóstico (LEV, 2020). Apenas 20 a 30% dos pacientes possuem bom prognóstico ao tratamento padrão de TNBC, com alta frequência de recorrência dentro de 1 a 3 anos após o diagnóstico (LEV, 2020). Com isso, como os pacientes geralmente não respondem às terapias hormonal ou terapias direcionada aos receptores, existem poucas alternativas de tratamentos (DOS SANTOS JESUS *et al.*, 2022).

A família de receptores EGFR desempenha a função do crescimento de células normais e malignas, bem como na prevenção de apoptose, resistência a drogas, células estaminais cancerígenas e metástase de inúmeros tipos de câncer. A família EGFR é composta por quatro membros e são receptores do fator de crescimento que atravessa a membrana celular (EGFR1, HER2, EGFR3 e EGFR4). EGFR1 (também conhecido como EGFR1 (HER1, c-erbB1), EGFR2 (c-erbB2, HER2), EGFR3 (c-erbB3, HER3) e EGFR4 (c-erbB4, HER4) (S STEELMAN *et al.*, 2016). O gene HER1 é expresso em cerca de 40% das pacientes com câncer de mama, e o gene HER2 em até 25% a 30%. A superexpressão de HER1 e HER2 está associada a um pior prognóstico clínico e prediz uma resposta menos favorável à terapia endocrinológica (ALANAZI; KHAN, 2016; KJAER *et al.*, 2018). Inúmeras vias de sinalização, como PI3K/PTEN/Akt/mTORC1, Ras/Raf/MEK/ERK, Jak/STAT e JNK, entre outras, podem ser induzidas por membros da família EGFR (S STEELMAN *et al.*, 2016).

A análise genômica do TNBC sugere alterações genéticas e instabilidade genômica, sendo as mutações somáticas mais frequentes observadas em TP53

(85%), PIK3CA (10%), USH2A (síndrome de Usher 2A) (9%), MYO3A (miosina IIIA) (9%), genes PTEN e RB1 (8%) e alterações em RB1 (5%), amplificação de MYC (26%) ou EGFR (5%). Sendo assim, entende-se a necessidade de desenvolvimento de diferentes métodos terapêuticos para cada subtipo molecular (LEV, 2020).

O Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) é uma glicoproteína pertencente à subclasse de receptores tirosina quinase (do inglês, *receptor tyrosine kinases* (RTKs)). Estes controlam importantes processos biológicos, como proliferação, diferenciação, metabolismo e sobrevivência celular por meio da ativação das vias de sinalização (HSU; HUNG, 2016; KJAER *et al.*, 2018; SIRKISOON *et al.*, 2016). A superexpressão do receptor EGFR é responsável por 50% dos casos de câncer de mama triplo-negativo. Além disso, apresenta alta taxa de crescimento, regeneração e metástase (SUN *et al.*, 2017).

Dentre os métodos mais usuais de detecção do câncer de mama, a mamografia tem contribuído para redução significativa das taxas de mortalidade dessa doença. A ressonância magnética também tem contribuído como um método não invasivo para o rastreamento do câncer (INCA, 2019; SUN *et al.*, 2017). Em relação aos tratamentos convencionais de câncer, a cirurgia, quimioterapia e radioterapia, possuem efeitos colaterais negativos para os pacientes e não garantem uma eficaz remoção das células malignas (WEI *et al.*, 2019). Como resultado, a resistência à terapia do câncer continua sendo a principal causa de insucesso no tratamento do paciente, uma vez que o DNA tumoral tem a capacidade de se reparar e criar resistência a medicamentos e a diferentes terapias (LI *et al.*, 2021).

2.7 TERAPIA FOTODINÂMICA E FOTOTÉRMICA

A fototerapia corresponde a um método de tratamento não invasivo, que utiliza agentes intermediários fotoativados, como transdutores fototérmicos ou FS sob irradiação. As fontes de radiação podem utilizar comprimentos de onda na faixa do visível ou do NIR, podendo ser fabricadas com baixo custo por meio da utilização de diodos emissores de luz (*Light emitting diodes*, LEDs). As fontes de irradiação na região do NIR são mais utilizadas para ativar o efeito terapêutico na fototerapia oncológica, devido à sua maior penetração tecidual, minimizando as absorções pelas moléculas de água e hemoglobina em tecidos biológicos (MOLKENOVA *et al.*, 2022).

Na TFT, a conversão da radiação incidente em calor é feita por meio de agentes transdutores fototérmicos, que permitem a ablação térmica dos tecidos tumorais (XU *et al.*, 2019; MOLKENOVA *et al.*, 2022; WAN *et al.*, 2018; PENG *et al.*, 2022; WANG *al.*, 2018). As vantagens significativas da TFT sobre os tratamentos convencionais incluem invasividade reduzida, alta especificidade para células cancerígenas e recuperação rápida (PENG *et al.*, 2022; WANG *al.*, 2018; KADKHODA *et al.*, 2021). Enquanto, a TFD emprega as moléculas fotossensíveis incorporadas aos tecidos a serem tratados e na presença de oxigênio molecular, seguido da irradiação em comprimento de onda específico, gerando ERO's (BOURAMTANE *et al.*, 2019; MOLKENOVA *et al.*, 2022; AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019). Também corresponde a uma opção de tratamento menos invasivo para o manejo de muitos tipos de cânceres e apresenta baixa toxicidade sistêmica (HOU *et al.*, 2022; KADKHODA *et al.*, 2021).

Todavia, normalmente é difícil alcançar um bom resultado terapêutico utilizando um único método de tratamento. Assim, a combinação de terapias tem crescido em pesquisa científica e no tratamento clínico (HOU *et al.*, 2022). As TFD/TFT quando combinadas, melhoraram a eficácia do tratamento, além de poderem diminuir significativamente a invasividade e a toxicidade sistêmica (XU *et al.*, 2019; WAN *et al.*, 2018).

Neste contexto, a identificação precisa das regiões tumorais e a confirmação da presença de agentes fototerapêuticos nas lesões cancerígenas podem ser facilitadas por nanopartículas, que combinam recursos fototerapêuticos e de imagem em uma única modalidade (WANG *al.*, 2018). As nanopartículas funcionalizadas com fotossensibilizadores podem proporcionar uma entrega eficaz de agentes terapêuticos aos tecidos tumorais profundos, permitindo a associação da TFD com outras terapias, como a radioterapia em cânceres mais agressivos em virtude do espalhamento da radiação ionizante pelas nanoestruturas, que aumenta a eficiência do tratamento (HOU *et al.*, 2022). Dentre os fotossensibilizadores, a Ce6 de segunda geração é frequentemente usada na TFD em virtude da elevada sensibilidade, eliminação rápida do organismo e pode ser fotoativada pela irradiação em comprimentos de onda da região de 660–670 nm, que permite a elevada eficiência na geração de ERO's (HOU *et al.*, 2022; AMIRSHAGHAGHI *et al.*, 2019).

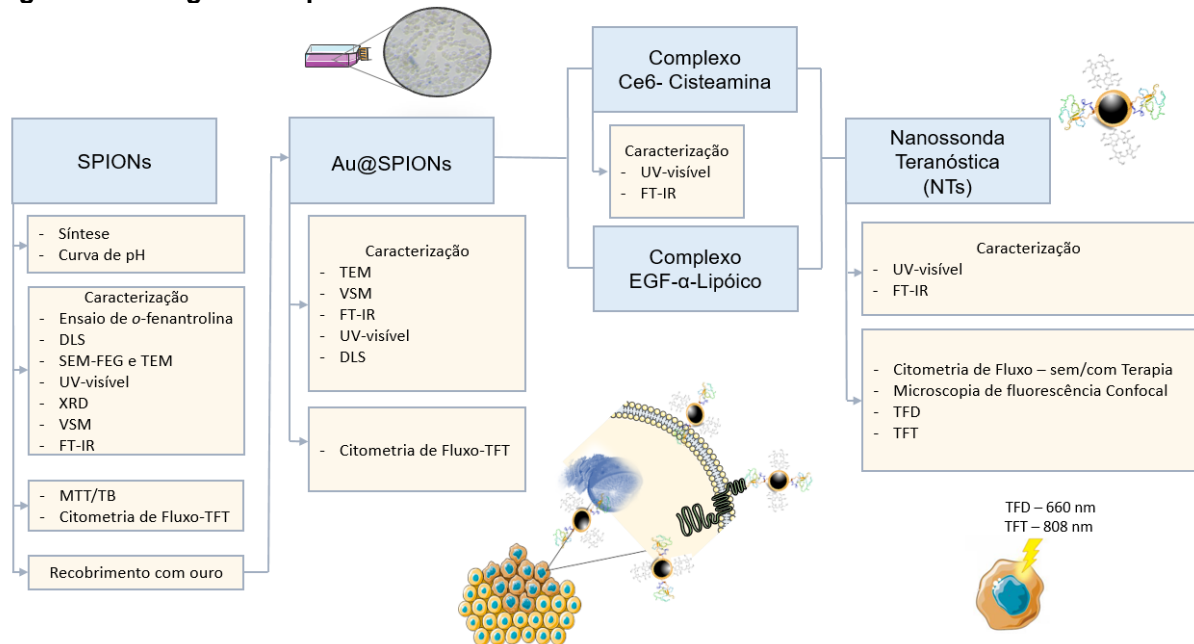
Dentre os nanomateriais, os metais de transição e seus óxidos são frequentemente utilizados em estudos para o tratamento e diagnóstico do câncer, devido à sua composição e características físico-químicas. Dentre eles, a SPIONs se

destacam na TFT pela eficiência na ablação precisa em tumores profundos, preservando os tecidos saudáveis circundantes (PENG *et al.*, 2022). Enquanto que as AuNPs têm se destacado na TFD, possibilitando um aumento de ERO's, consequentemente um aumento de eficiência (DOS SANTOS JESUS *et al.*, 2022). Desta forma a associação de nanopartículas e terapias podem aumentar a eficiência dos tratamentos contra o câncer.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As SPIONs foram primeiramente sintetizadas pelo método de coprecipitação química, posteriormente revestidas com ouro e funcionalizadas com o complexo Ce6-cisteamina e complexo EGF- α -Lipóico a proteína EGF para formação das Nanossondas Teranósticas (NTs). 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 das ligações químicas, por SEM-FEG e TEM para confirmação do diâmetro médio e de suas morfologias, por XRD para determinação da formação de fases cristalinas e por VSM para determinar as características magnéticas e a magnetização de saturação das soluções coloidais por meio da equação de Langevin. Após toda a caracterização, as nanopartículas foram estudadas *in vitro* nas linhagens celulares MCF 10A e MDA-MB-468 para análise de citotoxicidade, tempo de incorporação e internalização das NTs. A eficiência das NTs foi determinada por TFD e TFT. Na Figura 3 é apresentado o fluxograma das fases experimentais desta tese.

Figura 3: Fluxograma Experimental.



Fonte: Autor.

3.1 SÍNTESE DAS SPIONS

As SPIONs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação, como descrito por Massart (1981) (MASSART, 1981). O protocolo de síntese de Mérida e colaboradores (2015) (MÉRIDA *et al.*, 2015) foi adaptado por meio de uma colaboração entre o Laboratório de Nanossensores e o *Rinaldi Research Laboratory* da *University of Florida*. 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 mol/L e 0,4 mol/L, foram individualmente preparadas em 100 mL de água ultrapura previamente de-oxygenada com gás nitrogênio por 30 min. A ultrassonicação em banho foi realizada para solubilização dos sais, seguida por de-oxygenação e mistura dessas soluções. Uma agitação de 250 rpm, a 85 °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 foi realizada por meio da adição de citrato de sódio dihidratado ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) nas alíquotas, seguido de homogeneização em vortex por aproximadamente 0,5 min. A amostra foi levada ao ultrassom de ponta com alta energia por 30 min e em seguida, as alíquotas foram transferidas para tubos e centrifugadas a 1.800 rpm por 10 min, seguido de descarte do sobrenadante com ímã. Essa amostra novamente foi ressuspendida em $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, levada ao ultrassom de ponta por 30 min, sendo logo após centrifugada a 2.500 rpm por 10 min, seguido de descarte do sobrenadante com ímã. Na Figura 4 é apresentado o processo de síntese das SPIONs.

Figura 4: Síntese das SPIONs pelo método de coprecipitação.

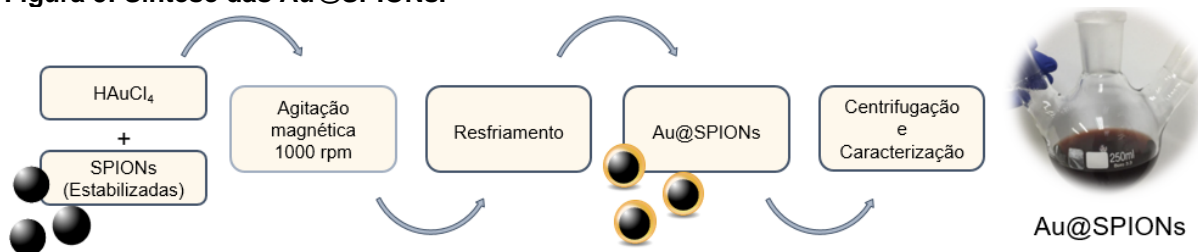


Fonte: Autor.

3.2 RECOBRIMENTO DAS SPIONS COM OURO – CORE-SHELL

As Au@SPIONs foram sintetizadas de acordo com o protocolo de síntese adaptado de Elbially e colaboradores (2019), SPIONs na concentração de 0,5 mg/mL foram adicionadas na solução de cloreto de ouro (HAuCl_4 – forma anidra) a 0,5 mmol/L e mantido sob agitação por 15 min. Posteriormente, o aquecimento foi interrompido e a solução mantida em agitação até à temperatura ambiente (ELBIALLY *et al.*, 2019). Na Figura 5 é apresentado o processo de recobrimento das SPIONs. As Au@SPIONs foram centrifugadas e caracterizadas pelas técnicas de Espectroscopia UV-visível, DLS, TEM, FT-IR e VSM.

Figura 5: Síntese das Au@SPIONs.



Fonte: Autor.

3.3 MODIFICAÇÃO QUÍMICA VIA CARBODIIMIDA

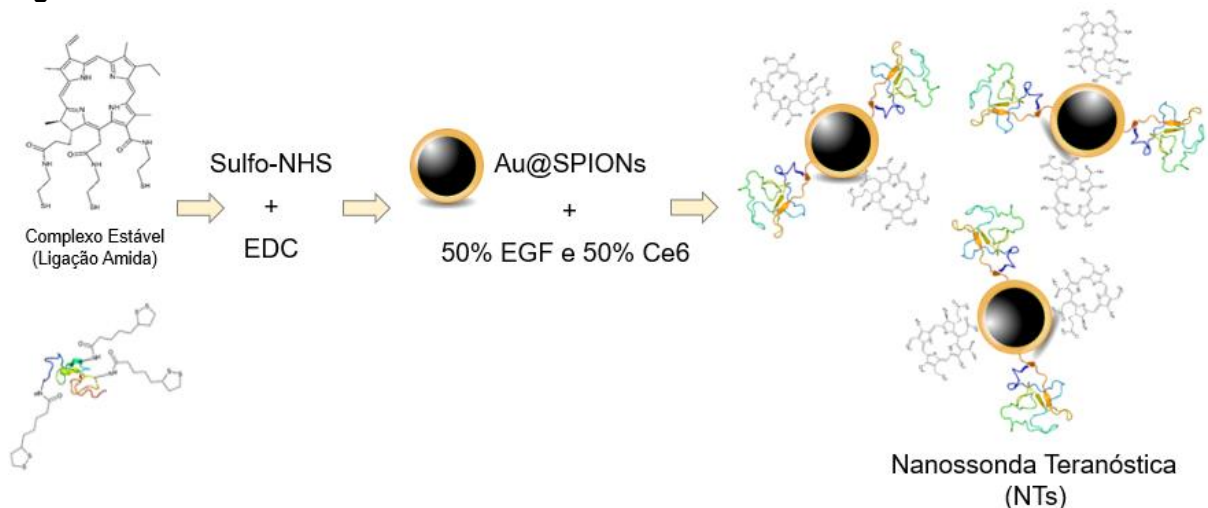
A molécula da Ce6 possui três grupos carboxílicos que por meio da ligação amida foram ligados a cisteamina para a formação do complexo Ce6-cisteaminea. O 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC, Sigma Aldrich, 22980) favorece a ligação dos grupos carboxílicos com o sulfo-NHS (N hydroxysulfosuccinimide, Thermo Scientific, 24510), forma um éster mais estável que o o-acilisourea e permite uma conjugação mais eficiente e uma ligação amida estável. A razão molar dos reagentes foram: 1 Ce6 (8,4 mM): 25 Sulfo NHS (187,5 mM): 10 EDC (83,5 mM): 3 Cisteamina (8 mM) (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017). A molécula de EGF humana (EGF, Sigma Aldrich, E9644) possui três grupos aminos que podem reagir com ácido carboxílico, sendo assim, a modificação dessa proteína ocorre pela adição do α -ácido lipóico (LA) (Sigma Aldrich, T5625) que forma uma ligação amida. O LA é ativado, adicionado a proteína, uma molécula de água é liberada para a formação do complexo EGF- α -LA. A razão molar dos reagentes corresponde a 120 LA (7,8 mM): 3200 Sulfo

NHS (187,5 mM): 1300 EDC (83,5 mM): 1 EGF (16 μ M) (LUCAS *et al.*, 2015). Para confirmação da formação do complexo, foi realizado o linker Ce6 com Cisteamina. Após a formação, 1,5 mL do complexo foi centrifugado à 8000 rpm por 3 min, sendo o processo de purificação realizado 2 vezes e as caracterizações dos sobrenadantes (S1, S2) e dos precipitados (L1, L2) medidos por espectroscopia de UV-visível.

3.4 NANOSSONDA TERANÓSTICA

As nanossondas foram produzidas utilizando Au@SPIONs previamente sintetizadas, as quais foram funcionalizadas aos complexos, EGF- α -ácido lipóico e o Ce6-cisteamina nas proporções 1:1, para o total recobrimento da área superficial do coloide. Primeiramente as Au@SPIONs foram incubadas com o complexo EGF- α -ácido lipóico sob agitação constante por 24 h. Após esse período, o complexo Ce6-cisteamina foi adicionado e a solução final foi novamente mantida sob agitação constante. O processo de purificação ocorreu por uma centrifugação à 8000 rpm por 3 min e sua caracterização obtida por Espectroscopia UV-visível e FT-IR. Na Figura 6 é mostrado uma representação do processo de preparo das Nanossondas Teranósticas.

Figura 6: Síntese das Nanossondas Teranósticas.



Fonte: Autor.

3.5 CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS

3.5.1 Análise de Espectroscopia de UV-Visível

As amostras de Au@SPIONs foram caracterizadas pela 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 através da 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 janela de safira (inferior) e fibra de quartzo (superior). Em todas as leituras, 2 μ L das amostras foram medidos e os resultados foram plotados com o auxílio do programa OriginPro versão 8.5.1. A concentração de ferro presente nas SPIONs foi determinada por meio de ensaios de o-fenantrolina, sendo também o resultado obtido por Espectroscopia de UV-visível.

3.5.2 Análise de Espalhamento Dinâmico da Luz

A análise de DLS foi realizada para determinar o diâmetro hidrodinâmico e a estabilidade das soluções coloidais, por meio do equipamento ZetaSizer nano – ZS90 da Malvern. O índice de refração utilizado foi igual a 1,450 para SPIONs e de 1,590 para Au@SPIONs. No equipamento foi definido o tempo de equilíbrio de 120 seg., com temperatura de 21°C. Um volume de 200 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 seg. A análise do Potencial Zeta determinou a estabilidade e a carga superficial das soluções coloidais, no modo “Zeta”, 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.

3.5.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise da morfologia e tamanho das nanopartículas foram feitas em parcerias com o laboratório Labas Dimare – INPE e com o *Centre Pluridisciplinaire de Microscopie et Microanalyse (CP2M) - Fédération Sciences Chimiques Marseille 9FSCM) - Aix-Marseille Université, França.*

A análise de Microscopia Eletrônica de alta resolução foi feita em SEM-FEG da Tescan (modelo MIRA3) em colaboração com o INPE. Primeiramente uma alíquota de 20 µL da solução coloidal foi adicionada sobre uma placa de silício com fita de carbono em *stub*, seco a vácuo e submetido ao processo de metalização com ouro. A imagem de SEM-FEG das SPIONs foi obtida com a configuração do equipamento em HV (alto vácuo): 15.0 keV, campo de visão: 1.38 µm, WD (com distância de trabalho): 4.72 mm, DET: In-Beam SE e SEM MAG (detector de Emissão de elétrons secundários na magnitude): 150 kx. Após a análise, as nanopartículas foram analisadas e contadas pelo programa ImageJ versão 1.48 para se obter o diâmetro físico das nanopartículas sintetizadas.

Na *Aix-Marseille Université*, as medidas foram realizadas com um Microscópio Eletrônico ultra-alta resolução da marca ZEISS, modelo Gemini 500 FEG, com imagens de elétrons secundários adquiridas com baixa tensão (1 kV e 0.5 kV). Para imagens de elétrons secundários (SE), este sistema é equipado com um detector In-lens, que detecta elétrons secundários diretamente no caminho do feixe, sendo ideal para exibir estruturas em superfícies. Para o preparo, 10 µL de cada uma das amostras foram secas nas grades em cobre revestidas com filme de carbono de 300 mesh, com a temperatura da estufa de 40°C. As imagens de SEM das SPIONs sem estabilização foram obtidas com os seguintes parâmetros: electron high tension (EHT): 1.00 kV, working distance (WD): 2.2 mm, Signal A: inLens, magnification (Mag): 153.39 KX, tamanho de cada pixel da imagem (Pixel Size): 242.6 pm, brightness (B):45.5%, contrast (C): 36.8%, tipo de aquisição para redução de ruído (noise Red.): Drift Comp. Frame Avg., velocidade de varredura (scan Speed):1 , Cycle Time: 43.1 secs, pressão na câmara do microscópio (P): 3.14×10^6 mbar, diâmetro do diafragma (Ap. Size): 20.00 µm. Já as SPIONs com estabilização, EHT:0.500 kV, WD: 2.3 mm, Signal A: inLens, Mag: 118.32 KX, Pixel Size: 943.6 pm, B:30.9%, C: 42.2%, Noise Red.: Line Avg, Scan Speed: 4, Cycle Time: 19.1 secs, P: 3.02×10^6 mbar, Ap. Size: 20.00 µm.

3.5.4 Análise de Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise da morfologia e do diâmetro físico das SPIONs e Au@SPIONs foram realizados em parceria com o laboratório da *Aix-Marseille Université*. Para a preparação das amostras, 10 μL de cada uma das nanopartículas foram secas em grades de cobre revestidas com um filme de carbono de 300 mesh, com temperatura de estufa de secagem de 40°C. As medidas de TEM foram realizadas no microscópio eletrônico FEI TECNAI G20 LaB6, com imagens em campo claro e campo escuro adquiridas com 200 kV de tensão de aceleração dos elétrons, em modo paralelo (TEM) e em modo varredura (STEM). Este microscópio é equipado com um detector EDS (Espectroscopia de raios X por dispersão em energia) OXFORD SDD, com o qual foram obtidos espectros e mapas EDS com a composição química das SPIONs e Au@SPIONs.

3.5.5 Análise de Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier

Os produtos de sínteses 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 Perkin-Elmer (modelo Spectrum 400), equipado com acessório de refletância total atenuada com pedestal de aço inox e cristal de diamante, localizado na Central de Laboratórios Multiusuários (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 e Au@SPIONs foram pipetadas e secas no pedestal do equipamento para melhor obtenção das absorções nos espectros, com auxílio de um jato de ar seco sem CO_2 gerado por um gerador de gases (ParKer).

3.5.6 Análise de Difração de Raios-X

A estrutura cristalina das SPIONs foi analisada por meio da técnica de difratometria de raios-X. Para a análise, as nanopartículas foram secas a vácuo e em seguida o pó foi compactado no porta-amostra. O difratômetro de raios-X utilizado foi o Shimadzu (modelo XRD-6000) com fonte de radiação monocromática Cu-K α ($\lambda =$

1,5418 Å), com uma tensão de 40 kV e corrente 30 mA, localizado no Laboratório de Cerâmicas Avançadas (IP&D/UNIVAP). As leituras foram feitas com fendas 0,3 e ângulo de difração (2θ) variando de 15° a 85° , passo angular de $0,02^\circ$ e tempo de contagem de 0,6 s. A análise dos dados foi realizada no software X'Pert High Score Plus com o auxílio das fichas de referência.

3.5.7 Análise por Magnetômetro de Amostra Vibrante

As medidas de curva de magnetização foram realizadas no Laboratório de Materiais Magnéticos, localizado no Departamento de Física dos Materiais e Mecânica, no Instituto de Física da Universidade de São Paulo (DFMT-IFUSP). Para esta análise, 30 mg de nanopartículas secas foram utilizadas no VSM com um eletroímã de 2T, à temperatura ambiente, com um campo magnético máximo de 20 kOe e 35 ciclos. A secagem das SPIONs estabilizadas e Au@SPIONs em lamínulas de vidro com dimensões de 5x5 mm também foi realizada para verificar possíveis alterações no comportamento da curva de magnetização das nanopartículas. O protocolo de medida utilizado para a análise de VSM é informado na Tabela 2, sendo H o campo externo aplicado, N-intervalos = número de pontos -1, no respectivo trecho do ciclo de histerese e o tempo total do ciclo de histerese foi de 32 min.

Tabela 2: Protocolo de medida do equipamento VSM.

H1 (kOE)	H2 (kOE)	N-intervalos	T_total (min)	T_VSM (seg)
20.0	5.0	30	3.0	1
5.0	0.5	25	2.5	1
0.5	0.5	50	5.0	1
0.5	-5.0	25	2.5	1
-5.0	20.0	30	3.0	1
20.0	5.0	30	3.0	1
5.0	0.5	25	2.5	1
0.5	0.5	50	5.0	1
0.5	5.0	25	2.5	1
5.0	20.0	30	3.0	1

Fonte: Autor.

3.5.8 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 utilizando a curva dos valores do Potencial Zeta em função do pH do meio. Primeiramente, as SPIONs estabilizadas na concentração de 1 mg/mL foram centrifugadas a 8.000 rpm por 3 min., em seguida avolumadas para 1 mL em meio com valores de pH iguais a 2, 4, 6, 7, 9 e 10.

3.5.9 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 $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ foram digeridas em ácido nítrico (HNO_3) a 70% em banho seco a 101°C por aproximadamente 12 horas. Posteriormente, 10 μL da amostra digerida foram evaporados a 115°C , seguidos da adição de 46 μL de água deionizada. Para a redução dos íons Fe^{3+} a Fe^{2+} , foram adicionados 30 μL de cloridrato de hidroxilamina ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$) e a reação mantida em repouso por 1 h. Após a redução, foram adicionados 49 μL de acetato de sódio (NaO_2CCH_3) como agente tamponante e 75 μL de 1,10-fenantrolina monohidratada ($\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), que formam o 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).

3.6 CULTURA DE CÉLULAS 2D

3.6.1 MCF 10A

A linhagem celular de mama humano, MCF 10A, proveniente do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ), foi cultivada em garrafas estéreis de polipropileno de 25 cm^2 com meio de cultura DMEM/F-12 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Ham's Nutrient Mixture F-12, Gibco - Life Technologies, 12500-062-10x1L),

suplementado com 5% (v/v) de soro de cavalo (Gibco - Life Technologies, 16050122), 20 ng/mL de EGF (Sigma Aldrich, E9644), 0,5 mg/mL de hidrocortisona, 100 ng/mL de toxina de cólera (Sigma Aldrich, C8052-.5MG) e 10 µg/mL de insulina (Sigma Aldrich, I9278-5ML). A cultura foi mantida em estufa de crescimento a 37 °C com 5% de CO₂ (Thermo Scientific, water Jacket serie 8000). O meio foi substituído a cada três dias e as células subcultivadas a cada 25 dias, após tripsinização com solução de Tripsina-EDTA 0,25%. Todos os experimentos com essa linhagem foram realizados em triplicata.

3.6.2 MDA-MB-468

A linhagem celular de adenocarcinoma mamário humano, MDA-MB-468, também proveniente do BCRJ, foi cultivada em garrafas estéreis de polipropileno de 25 cm² com meio de cultura L-15 (Leibovitz, Sigma Life Science, L4386-10x1L) e suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (Life Technologies, 16000-044). A cultura celular foi mantida em estufa de crescimento a 37°C em 95% de umidade, sem adição de CO₂ (Thermo Scientific, water Jacket serie 8000). O meio foi substituído a cada dois dias e as células subcultivadas a cada 15 dias, após tripsinização com solução de Tripsina-EDTA 0,25%. Todos os experimentos com essa linhagem foram realizados em triplicata.

3.7 ANÁLISE DO TEMPO DE INTERNALIZAÇÃO DAS NANOSSONDAS TERANÓSTICAS

A análise de Citometria de fluxo foi utilizada para investigar o tempo de internalização das Nanossondas Teranósticas nas linhagens celulares MCF 10A e MDA-MB-468. As células foram tripsinizadas e plaqueadas com 1×10^5 células/mL em uma placa de 96 poços. Após 24h de adesão celular, o meio de cultura completo foi substituído por outro meio com nanossondas teranósticas (recobrimento de 50% complexo Ce6-cisteamina e 50% complexo EGF α -La), com a concentração final de 2 µg/mL da Ce6 e tempos de incubação de 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min. Decorrido os períodos de incorporação, as células foram lavadas duas vezes com 100 µL de solução de tampão fosfato-salino (PBS 1x, pH 7.2) e removidas dos poços utilizando solução de tripsina-EDTA a 0,025%. Após a remoção da solução de tripsina, as células

foram transferidas para microtubos estéreis e receberam lavagens com solução de tampão fosfato-salino (PBS, pH 7.2). Os dados foram coletados pelo citômetro de fluxo Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences) com excitação do laser de 488 nm, 640nm. Detecção do espalhamento da luz Forward ($0^{\circ}\pm 13^{\circ}$) and Side ($90^{\circ}\pm 13^{\circ}$). Filtros ópticos de detecção de emissão: FL1 533/30 nm (eg, FITC/GFP); FL2 630/22 nm (eg, PE/PI); FL3 682/23 nm (eg, PerCP) e FL4 660/20nm (eg, APC). Por fim, os dados coletados foram processados no software BD Accuri C6 system.

3.8 ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL

A análise de Microscopia de fluorescência confocal foi realizada para confirmar a internalização das Nanossondas Teranósticas nas linhagens celulares MCF10A e MDA-MB-468. Para os ensaios, utilizou-se lamínulas circulares de borossilicato no interior de uma placa de 24 poços. As células foram tripsinizadas, em cada poço foi adicionado 4×10^5 células/mL e após 24h de adesão celular, o meio de cultura completo foi substituído por outro meio com Nanossondas Teranósticas (recobrimento de 50% complexo Ce6-cisteamina e 50% complexo EGF α -La) com a concentração final de 2 μ g/mL da Ce6, com tempo de incubação de 2 horas. Decorrido os períodos de incorporação, os poços foram lavados duas vezes com 150 μ L de tampão fosfato-salino (PBS 1x, pH 7,2). As lamínulas foram fixadas com paraformaldeído (4%) por 15 min, retiradas dos poços, lavadas por imersão em PBS e fixadas em lâminas contendo aproximadamente 8 μ L do reagente Prolong Gold Antifade Mountant (Life Technologies, P3691) com marcador de DNA DAPI (DAPI, ThermoFisher Scientific) (CASTILHO *et al.*, 2021). O DAPI (2-(4-Amidinofenil)-6-indolecarbamidina dicloridrato) se liga ao DNA nas regiões A-T e proporcionando melhor análise do núcleo celular. As imagens foram obtidas pelo microscópio de fluorescência e confocal Zeiss LSM 700 laser-scanning (Carl Zeiss AG, Germany) (Convênio FINEP 01.13.0275.00 – MIPPGU) da Central de Laboratórios Multiusuários (IP&D/UNIVAP), com objetiva Zeiss Plan-apochromat 63x/1.4 Oil Iris M27. As imagens foram obtidas utilizando um laser line de 405 nm (5mW) para o DAPI (emissão de 435 nm) e um laser line de 639 nm (5mW) para a Ce6 (emissão de 669 nm). Por fim, as imagens foram processadas no software ZEISS ZEN 2 Microscope (VIEIRA *et al.*, 2022).

3.9 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE DAS SPIONS E AU@SPIONS

As viabilidades celulares das linhagens MCF 10A e MDA-MB-468 foram determinadas pelas metodologias: colorimétrica com MTT (3-(4,5-dimetil) tiazol-2-il-2,5-difenil brometo de tetrazólio, Sigma Aldrich, M5655); e método de exclusão utilizando o corante azul de tripan (3,3'- (3,3'-dimetil[1,1'-bifenil] -4,4'-diyl) bis (azo)] bis [5-amino-4-hidroxynaphthaleno-2,7- disulfonato, Sigma Aldrich, T8154). O ensaio colorimétrico MTT é um método versátil e quantitativo, que tem avanços significativos em relação às técnicas tradicionais de ensaios de proliferação e citotoxicidade (BERRIDGE, HERST, TAN, 2005). A metodologia colorimétrica com MTT avaliou a atividade mitocondrial, que foi obtida por meio da redução do sal tetrazolium e formação dos cristais de Formazan, de cor violácea, com absorção em 570 nm (STOCKERT, 2012). A leitura de absorção foi realizada em triplicata pelo espectrofotômetro Synergy HT Multi-Detection Microplate Reader (BioTek Instruments, USA) do Laboratório de Biologia Celular e Tecidual (IP&D/ UNIVAP). O valor da atividade mitocondrial foi determinado pela Equação 2.

Equação 2: Cálculo da atividade mitocondrial em porcentagem.

$$\text{Atividade Mitocondrial (\%)} = \frac{Abs_{amostra} - Abs_{branco}}{Abs_{controle} - Abs_{branco}} \times 100$$

O método de exclusão do corante Azul de Tripan 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 15 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 em porcentagem.

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

3.10 ENSAIO DE TERAPIA FOTODINÂMICA EM CULTURA CELULAR

Para a ensaio de TFD, a suspensão de 1×10^5 células/mL (MCF 10A e MDA-MB-468) foi aplicada em placas de 96 poços contendo meio de cultura completo. Após

24 h de adesão celular, o meio foi substituído pelas Nanossondas teranósticas. As células foram mantidas em contato com a substância por 2 h, 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, 25 mW, na dose de 25 J/cm², sendo a placa posicionada a 1,5 cm de distância da fonte de irradiação.

3.11 ENSAIO DE TERAPIA FOTOTÉRMICA EM CULTURA CELULAR

Para a ensaio de TFT, a suspensão de 1x10⁵ células/mL (MDA-MB-468) foi aplicada em placas de 96 poços contendo meio de cultura completo. Após 24 h de adesão celular, o meio foi substituído pelas nanopartículas e Nanossondas Teranósticas. As células foram mantidas em contato com a substância por 2 horas, sob condições de cultivo. Decorrido o tempo de incorporação, o meio contendo a substância foi removido, os poços lavados com PBS e adicionou-se um novo meio de cultura completo para a irradiação utilizando o LED no infravermelho próximo ($\lambda = 808$ nm; 17,3 mW, 3,3 J/cm²) por 10 min (GHAZNAVI *et al.*, 2017; ELBIALY *et al.*, 2019; MIN *et al.*, 2019).

3.12 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE CELULAR – ANÁLISE DE CITOMETRIA DE FLUXO

A análise de Citometria de Fluxo foi realizada para investigar o tipo de morte celular após TFT, com nanopartículas na linhagem celular MDA-MB-468. Para esta análise, foram utilizadas SPIONs (0,5; 10 e 75 µg/mL); SPIONs (0,5; 10 e 75 µg/mL) + Ce6 (1,2 µg/mL); Au@SPIONs (75 µg/mL); Ce6 (1,2 µg/mL) e NTs (2 µg/mL) e TFD com NTs (2 µg/mL), incubadas a 37°C com 95% de ar atmosférico por 2h. Após a incubação, as células foram lavadas em solução salina tamponada com fosfato (pH 7,2) e separadas dos poços usando solução de tripsina-EDTA a 0,025%. Após a remoção, as células foram realocadas para microtubos estéreis e receberam coloração de anexina V (AnnV) e iodeto de propídio (PI) para diferenciação em células viáveis (AnnV- PI-), apoptóticas (AnnV+ PI-) e necrose (AnnV+ PI+). Após o processo de coloração, as células receberam várias lavagens em solução salina tamponada

com fosfato (pH 7.2). Os dados foram coletados usando o citômetro de fluxo Accuri™ C6 Plus (BD Biosciences) (Convênio FINEP 01.18.0053.00 – REECAM) e processados no software do sistema BD Accuri C6.

3.13 QUANTIFICAÇÃO DAS ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO

As análises de ERO's produzidas pela nanossondas foram quantificadas utilizando o marcador 2',7'-diacetato dichlorodihydrofluorescein (H₂DCFDA, Life Technologies™, D399). Após o tratamento via TFD, a placa de cultura foi analisada para determinar as ERO's produzidas, sendo adicionado 5 µL de H₂DCFDA a 30 µM e incubado por 1 h em ambiente escuro a 37°C. A intensidade de fluorescência foi mensurada pelo espectrofotômetro de placa do Laboratório Bioquímica Aplicada Engenharia Biomédica (IP&D/UNIVAP). A leitura de absorção em 570 nm foi realizada em triplicata, pelo equipamento Synergy HT Multi-Mode Microplate Reader (BioTek Instruments, USA) com excitação de 480 nm e emissão de 530 nm.

3.14 ESTUDO PRELIMINAR EM CULTURA CELULAR 3D

A cultura celular tridimensional permitir a formação de um microambiente heterogêneo com maior representatividade dos mecanismos celulares. Sendo assim, a cultura 3D foi desenvolvida para efeito de comparação aos experimentos bidimensionais *in vitro*. Esferoide de câncer de mama foram produzidos de acordo com protocolo de (YANG *et al.*, 2008) por meio da linhagem celular MDA-MB-468 em agarose micro moldada com o objetivo de investigar a capacidade diagnóstica das NTs. Os moldes foram preparados em agarose 2% e os tumores cultivados por 21 dias. A análise de Microscopia de fluorescência confocal foi realizada para confirmar a internalização das NTs nesse microambiente. O procedimento experimental foi desenvolvido igual ao modelo 2D como mostrado na seção (3.8 ANÁLISE DE MICROSCOPIA DE FLUORESCÊNCIA CONFOCAL), entretanto na análise de internalização, as NTs foram incubadas em tempos de 30, 60, 120, 180, 240 min.

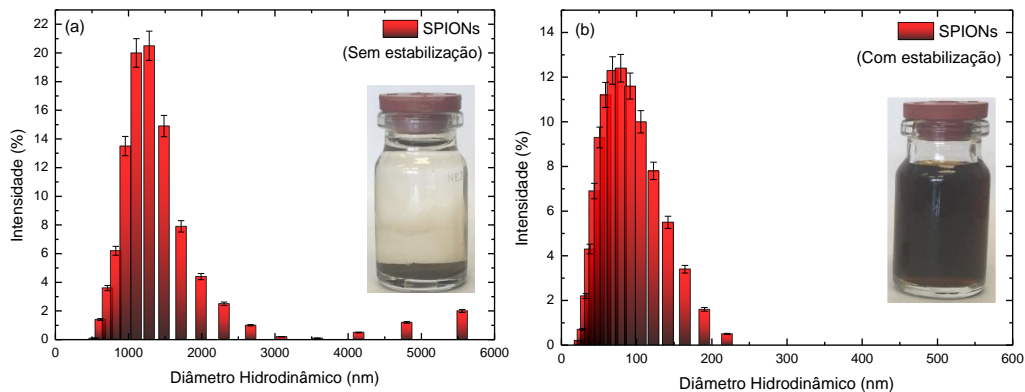
4 RESULTADOS

Nesta sessão são apresentados os resultados experimentais obtidos desta tese, iniciando com a síntese e caracterização das nanopartículas de óxido de ferro (SPIONs), nanopartículas de óxido de ferro recobertas com ouro (Au@SPIONs), seguindo pelo processo de produção dos complexos e funcionalização para formação das Nanossondas Teranósticas (NTs). Também foi descrito o tempo de internalização e o local internalizado das NTs nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF 10A, bem como a ausência de citotoxicidade das nanopartículas na ausência de terapias. A citotoxicidade das nanopartículas produzidas após terapias fototérmica (TFT) e fotodinâmica (TFD) foi determinada por Citometria de Fluxo, bem como os resultados de espécie reativas de oxigênio obtidos com após TFD. Por fim, estudos iniciais com a cultura 3D na linhagem celular MDA-MB-468 foram apresentados para corroborar com os resultados na cultura 2D.

4.1 CARACTERIZAÇÃO DAS SPIONS E AU@SPIONS

Após o processo de síntese, observou-se que a solução coloidal 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 . Na Figura 7 são apresentados os dados de DLS, que indicaram tamanho médio de 1,28 μm com índice de polidispersividade (Pdl) 0,151 para SPIONs sem estabilizante (Figura 7a), o que demonstra a presença de agregados e uma ampla distribuição de tamanho. Por outro lado, as SPIONs com estabilizante apresentaram um diâmetro médio de 69,70 nm e Pdl 0,170 (Figura 7b), o que confirma que os íons de citrato melhoram a distribuição de tamanho e preserva as dimensões do material na nanoescala. Embora, o potencial Zeta das SPIONs sem estabilização estivesse na região de estabilidade coloidal, -35,5 mV, a sedimentação desta amostra foi observada, conforme apresentado na Figura 7 (a). Porém, a solução coloidal de SPIONs estabilizadas apresentaram um maior valor de potencial Zeta de -48,6 mV, com pH do meio em 8, permanecendo estáveis ao longo tempo (Figura 7 (b)).

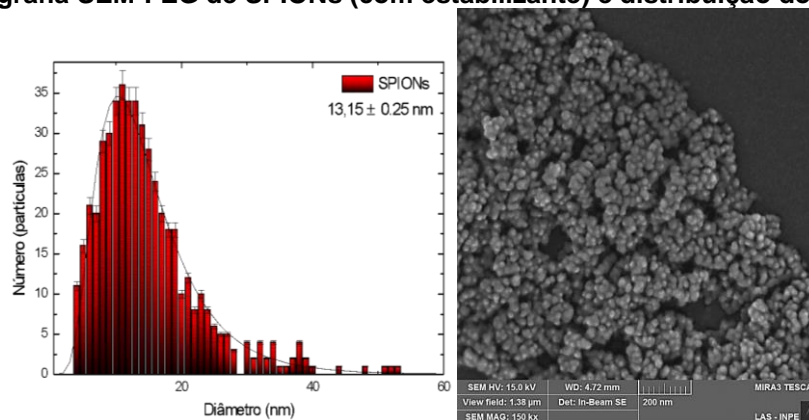
Figura 7: Distribuição de tamanho das SPIONs (a) sem e (b) com estabilizante.



Fonte: Autor.

A micrografia obtida por SEM-FEG, apresentada na Figura 8 foi obtida em colaboração com Laboratório Labas Dimare – INPE. Nesta análise, observou-se a morfologia das nanopartículas em forma de esferas de SPIONs (estabilizadas com citrato de sódio), e uma distribuição de partículas com diâmetro na escala nanométrica. A distribuição do tamanho físico foi obtida utilizando o software ImageJ versão 1.48. Assim, no mínimo 500 nanopartículas foram consideradas nesta análise, com a relação de espectro $\leq 1,6$ e o tamanho médio encontrado de $13,15 \pm 0,25$ nm. Uma vez que o DLS é sensível aos agregados, enquanto as imagens SEM-FEG são de partículas individuais, foi observada uma diferença entre os diâmetros hidrodinâmico e físico das nanopartículas.

Figura 8: Micrografia SEM-FEG de SPIONs (com estabilizante) e distribuição do diâmetro físico.

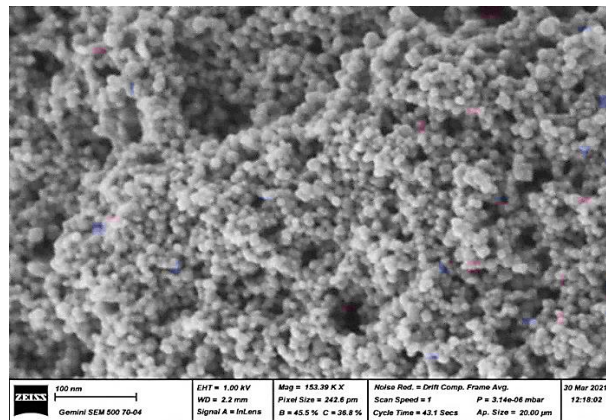


Fonte: Autor.

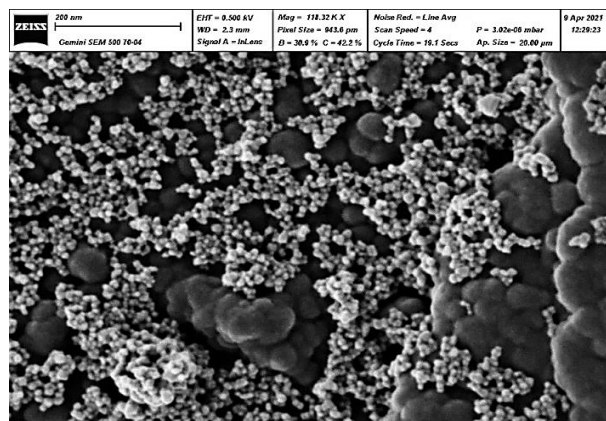
Na Figura 9 são apresentadas as micrografias de SEM, em colaboração com laboratório da Aix-Marseille Université, França. A aquisição de imagens em baixa tensão (1 kV e 0,5 kV) de aceleração dos elétrons foi adequada para a observação de nanopartículas, uma vez que aumenta o contraste de topografia e o feixe penetra apenas algumas dezenas de nanômetros. Para obter imagens em alta ampliação, a distância de trabalho foi realizada na ordem de 2 mm. Na (Figura 9a) de SPIONs sem o processo de estabilização, observou-se aglomerados de nanopartículas de óxido de ferro enquanto que na (Figura 9b), SPIONs estabilizadas com citrato de sódio, foi verificado a presença de SPIONs (contraste claro) sobre uma superfície de cobre (contraste escuro), o diâmetro das SPIONs variou entre 6 e 10 nm.

Figura 9: Micrografia SEM das SPIONs (a) sem e (b) com estabilizante.

(a) SPIONs (sem estabilizante)



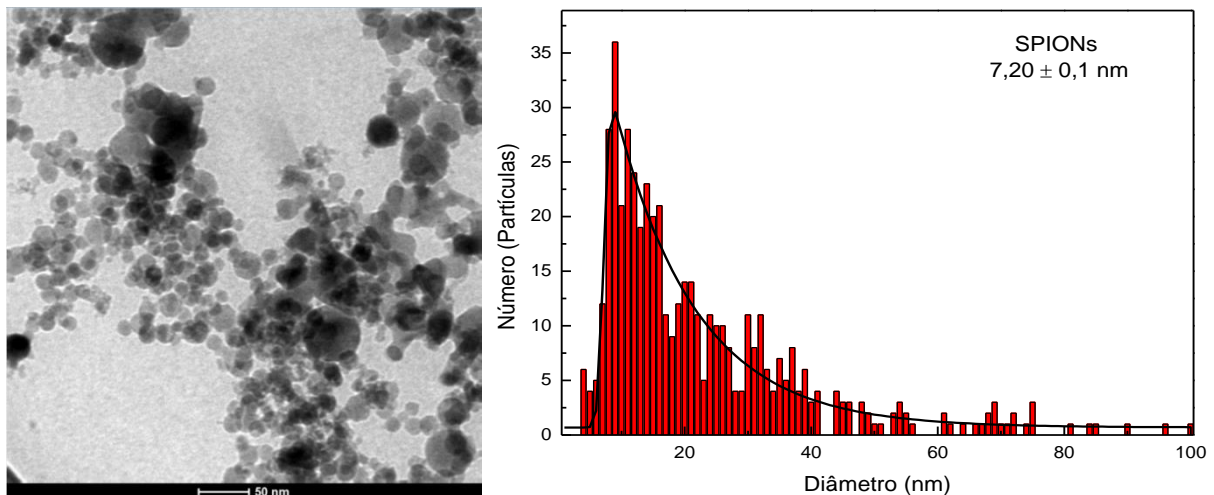
(b) SPIONs (com estabilizante)



Fonte: Autor.

As micrografias de TEM são apresentadas na Figura 10, sendo fruto da colaboração com laboratório da *Aix-Marseille Université*. A aquisição das imagens de TEM em campo claro foram adquiridas com tensão de 200 kV, sendo possível confirmar a morfologia esférica das nanopartículas produzidas por coprecipitação e estabilizada com citrato de sódio. Após o tratamento e análise pelo o software ImageJ versão 1.48 foi possível obter o cálculo do diâmetro médio das SPIONs, considerando-se no mínimo 500 nanopartículas com proporção entre suas dimensões $\leq 1,6$. Para a obtenção do histograma, também apresentado na Figura 10, foi aplicado a função log normal nos dados e obtido um valor de $7,2 \pm 0,1$ nm.

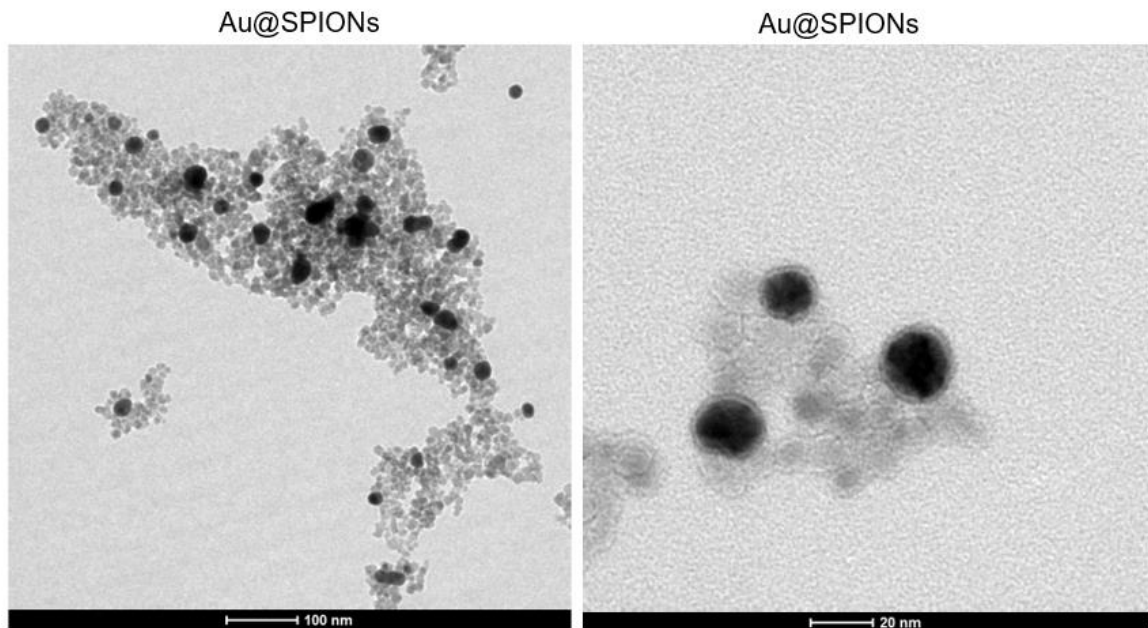
Figura 10: Micrografia TEM das SPIONs e histograma de tamanho.



Fonte: Autor.

A morfologia esférica das Au@SPIONs é apresentada pelas micrografias de TEM da Figura 11, obtida em campo claro. Na aquisição, as imagens podem ser registradas em campo claro ou escuro, dependendo da abertura da objetiva. A imagem de campo claro é gerada pela seleção do feixe de elétrons transmitido para a formação do contraste, que varia a intensidade dependendo do ponto da amostra. Enquanto que o campo escuro, a abertura da objetiva seleciona o feixe difratado, destacando as regiões de maior número atômico em virtude do espalhamento acentuado, e conseqüentemente maior contribuição no feixe difratado.

Figura 11: Caracterização por TEM das Au@SPIONs.

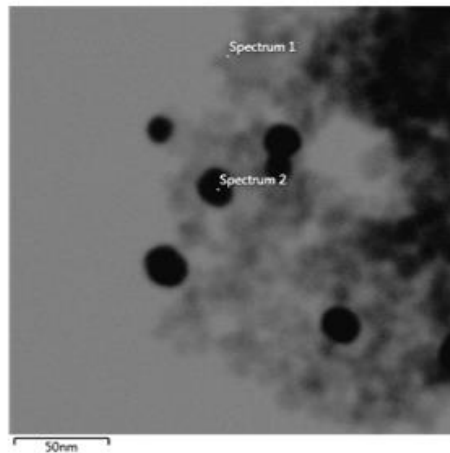


Fonte: Autor.

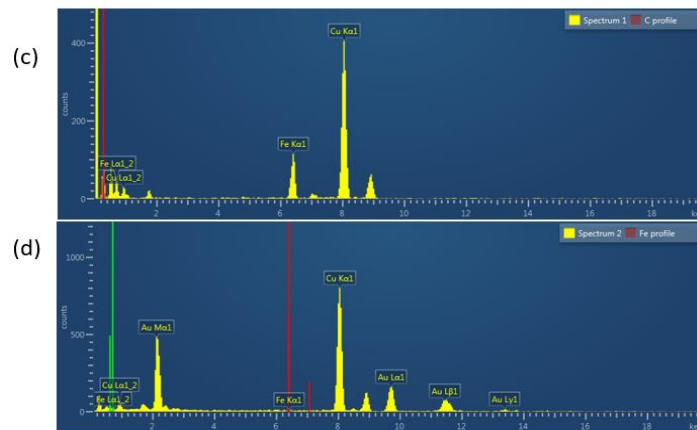
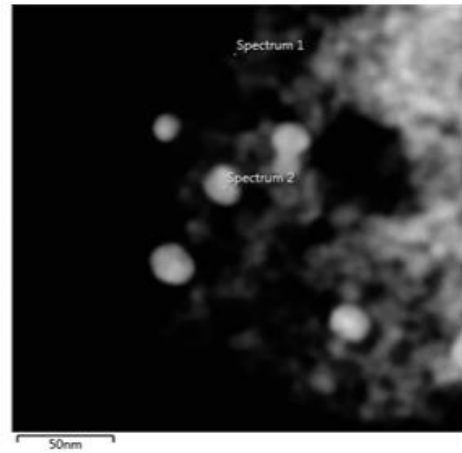
Na Figura 12 são apresentadas as micrografias de TEM em modo varredura das Au@SPIONs em campo claro e campo escuro com resultados da Espectroscopia de raios-X por energia dispersiva (EDS), que fornecem a composição química das partículas observadas. As aquisições destas imagens foram obtidas em campo claro e escuro com tensão de 200 kV. No campo claro, o elemento ouro é identificado nas esferas escuras, já o ferro é encontrado nas esferas claras. Quando a mesma imagem é analisada no campo escuro, observamos o oposto, o Au torna-se claro e Fe escuro.

Figura 12: Análise de TEM e EDS das Au@SPIONs: a) micrografia de campo claro; b) micrografia de campo escuro; c) Espectro de EDS marcador "Spectrum 1"; d) Espectro de EDS marcador "Spectrum 2"; e) Micrografia com mapa EDS de distribuição de Fe e Au.

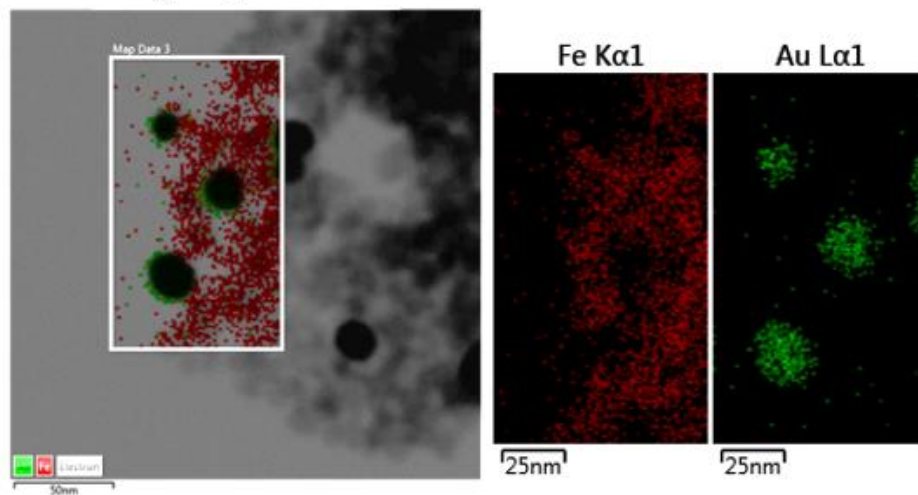
(a) Au@SPIONs (Campo claro)



(b) Au@SPIONs (Campo escuro)



(e) Au@SPIONs



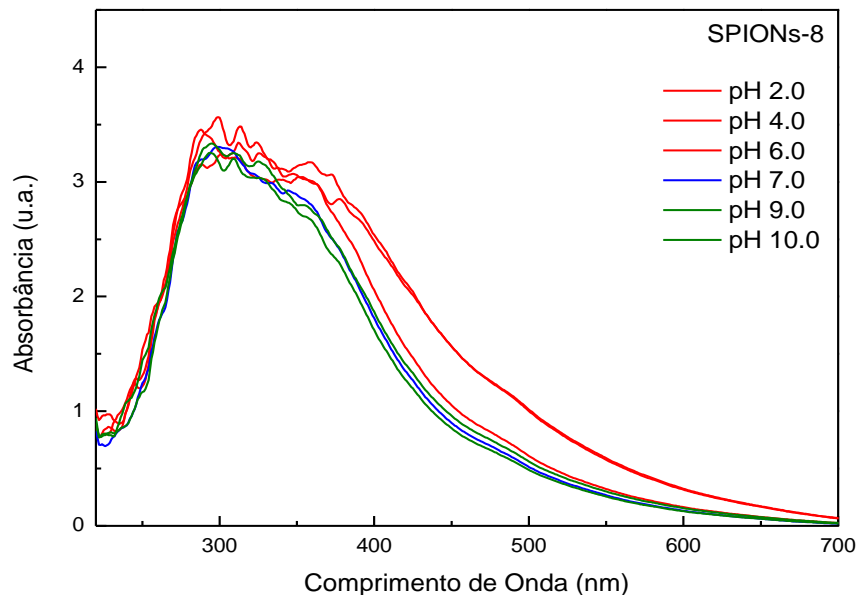
Fonte: Autor.

Na Figura 12c/d, nos resultados do Spectrum 1 foi identificado apenas a presença do elemento químico Fe, enquanto no Spectrum 2 a presença de Au e Fe.

O cobre identificado deve-se à grade na qual a amostra foi depositada. No processo de recobrimento ainda existe a presença de SPIONs que não foram recobertas, visto que o processo de síntese para formação das nanopartículas *core-shell* se inicia com SPIONs sintetizadas e estabilizadas. A confirmação desse resultado foi obtida pelo mapa EDS de distribuição de Fe e Au da (Figura 12e).

Na Figura 13 é apresentado o comportamento da curva no UV-visível das SPIONs estáveis, quando submetido ao processo de centrifugação 8.000 rpm por 3 min., e ressuspendidas em meio ácido ou alcalino.

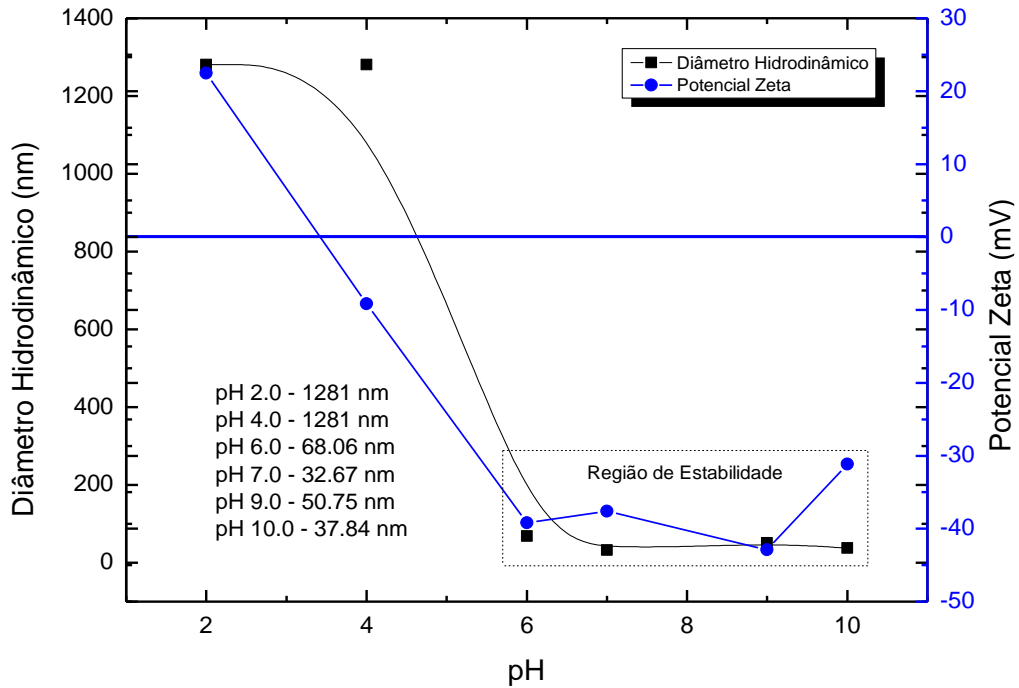
Figura 13: Caracterização por Espectroscopia UV-visível da curva de pH das SPIONs-8.



Fonte: Autor.

Na Figura 14 são apresentados os resultados da distribuição do diâmetro hidrodinâmico das SPIONs no modo número de partículas, bem como a relação do potencial Zeta e pH do meio da solução coloidal de SPIONs-8. Em meios ácidos ocorreu uma desestabilização das nanopartículas, aumentando seu tamanho, enquanto na presença de meio alcalino não houve alterações significativas de sua dimensão.

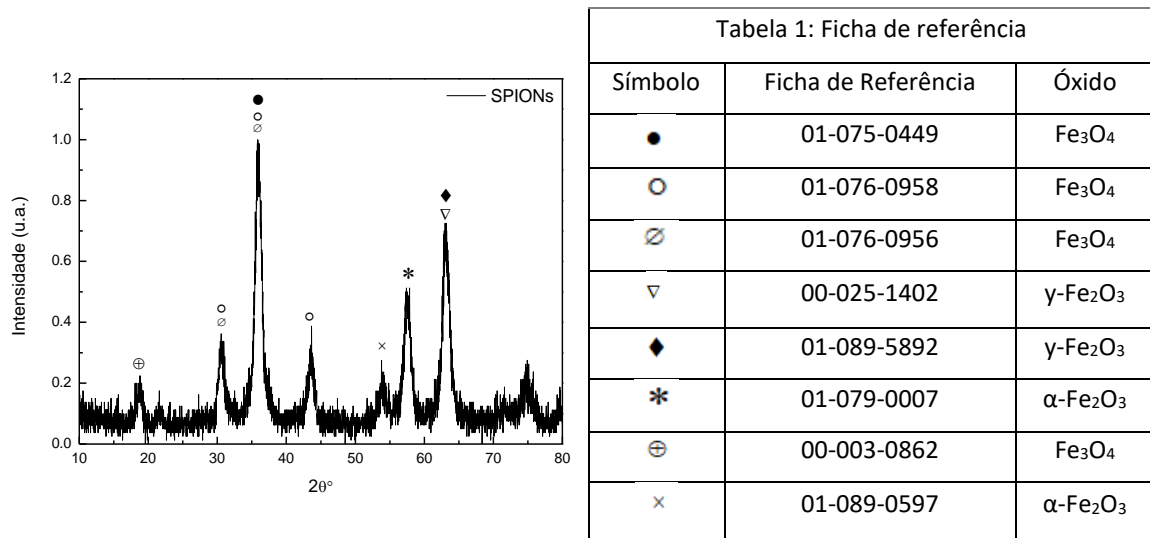
Figura 14: Caracterização por Espalhamento dinâmico da luz da curva de pH das SPIONs-8.



Fonte: Autor.

Na Figura 15 é mostrado Difratoograma de Raios-X das SPIONs (com estabilização), bem como uma tabela com a descrição das fichas de referência encontrados pelo software *X'Pert High Score Plus*. Nesta análise identificamos a presença dos principais óxidos formados pela coprecipitação, entretanto no pico de maior intensidade foi identificado apenas a Fe_3O_4 , que infere uma maior porcentagem desse tipo de óxido na amostra, sugerindo que as nanopartículas são superparamagnéticas.

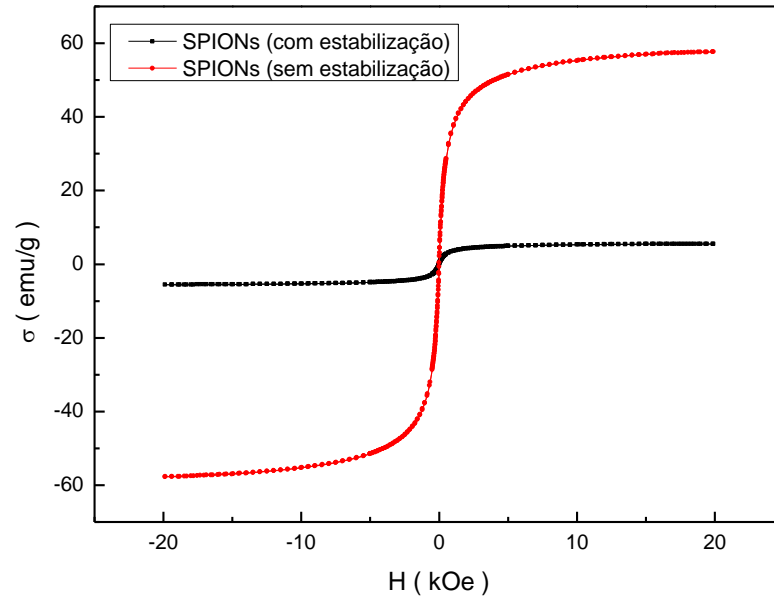
Figura 15: Difratograma de Raios-X das SPIONs e a Tabela com as fichas de referência encontrados.



Fonte: Autor.

Na Figura 16 são apresentadas as curvas de VSM das nanopartículas de óxido de ferro sem e com o processo de estabilização com citrato de sódio. Para este processo, 30 mg de cada amostra foram medidos no equipamento por meio da aplicação de um campo magnético entre as bobinas e em temperatura ambiente. O campo magnético externo aplicado induziu a magnetização da amostra em função do tempo, ocorrendo a orientação dos spins das SPIONs na direção desse campo. A variação do campo magnético proporcionou a formação de uma corrente nas bobinas, que foram convertidas em informações sobre as propriedades magnéticas do nanomaterial. A magnetização das SPIONs foi proporcional ao aumento do campo magnético externo, até se tornar constante (magnetização de saturação) que é o ponto máximo na curva. Ao alcançar a magnetização de saturação, ocorreu a diminuição do campo magnético até zero (valor nulo). Quando o campo magnético foi invertido, a amostra foi perdendo a magnetização (campo coercitivo) até que os spins estavam desordenados e com o campo magnético no sentido oposto, a magnetização foi atingida com o mesmo valor da magnetização de saturação, mas em módulo.

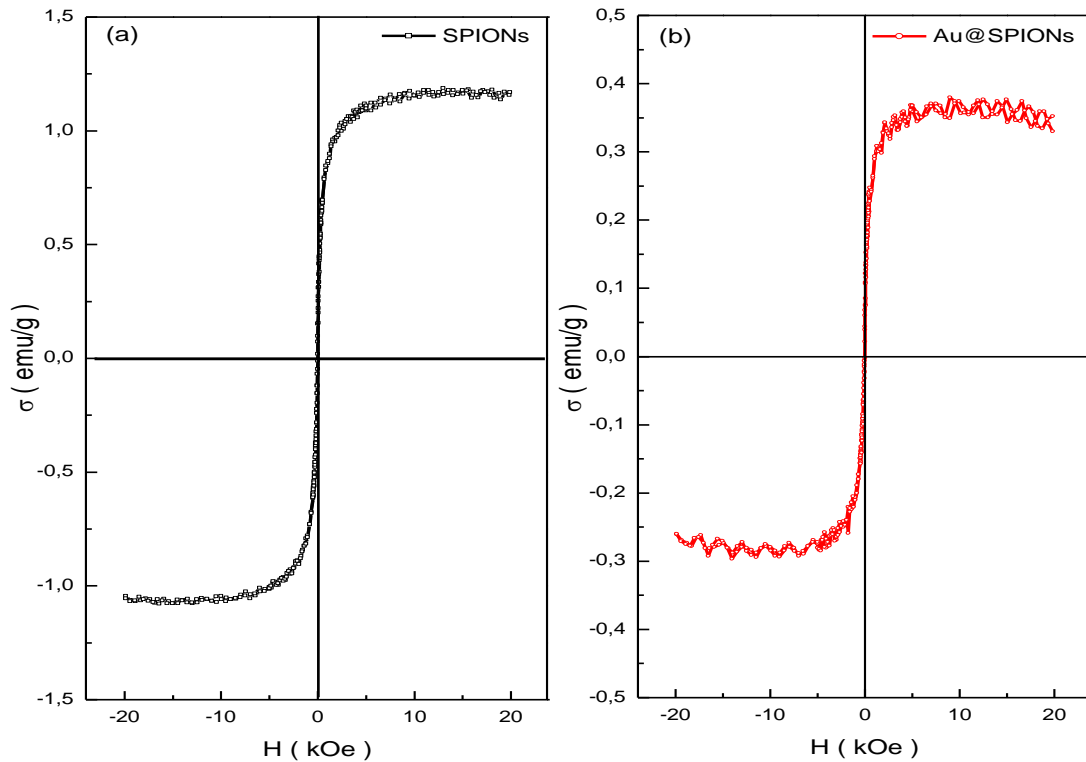
Figura 16: Caracterização por VSM das SPIONs sem e com o processo de estabilização com citrato de sódio.



Fonte: Autor.

As Au@SPIONs quando secas, tendem a formar um filme fino sobre a superfície do suporte, o que dificulta a obtenção de uma quantidade considerável de pó para a análise. Sendo assim, as soluções coloidais foram depositadas sobre uma lamínula de vidro com dimensões de 5x5 mm, permitindo comparar as nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com citrato de sódio (SPIONs) e recobertas com ouro (Au@SPIONs). Na Figura 17 são apresentadas as curvas de VSM das nanopartículas magnéticas sintetizadas, a aplicação de campo magnético externo permite a orientação dos spins no material, o momento de dipolo magnético da amostra dá origem a um campo magnético que oscila em função do tempo, devido a movimentação imposta pelo porta amostra do equipamento. Este campo magnético oscilante induz uma corrente nas bobinas de captação do VSM, sendo a corrente proporcional a magnetização da amostra.

Figura 17: Caracterização por VSM das SPIONs (a) e Au@SPIONs (b).



Fonte: Autor.

Desta forma, a magnetização das nanopartículas, bem como o valor de susceptibilidade magnética podem ser calculados por meio das Equações 3 e 4, respectivamente.

Equação 4: Cálculo da magnetização das nanopartículas.

$$M = \frac{\mu}{m}, \text{ sendo } \{ M = \text{magnetização } \mu = \text{momento magnético } m = \text{massa}$$

Equação 5: Cálculo da susceptibilidade magnética das nanopartículas.

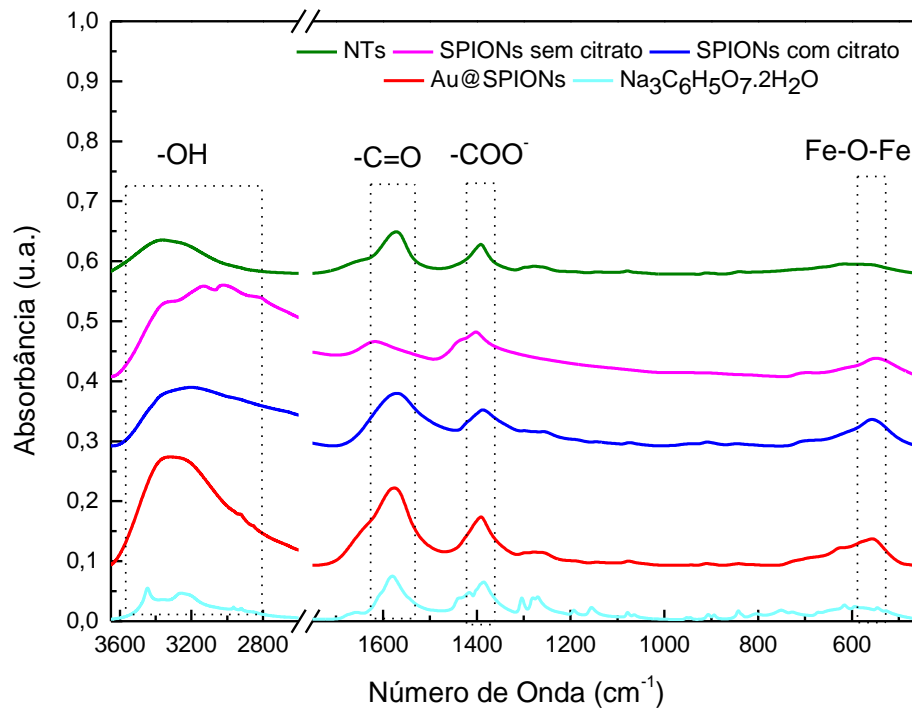
$$k = \frac{M}{H}, \text{ sendo } \begin{cases} K = \text{susceptibilidade magnética} \\ M = \text{magnetização} \\ H = \text{campo magnético} \end{cases}$$

As SPIONs sem e com estabilização (Figura 16) apresentam uma magnetização de saturação de 57 emu/g e 5,4 emu/g, com susceptibilidade magnética

de $2,85 \times 10^{-3}$ emu/gOe e $2,7 \times 10^{-4}$ emu/gOe, respectivamente. Já as nanopartículas que foram depositadas nas lamínulas (Figura 17), apresentaram uma magnetização de saturação de 1,15 emu/g para as SPIONs e 0,34 emu/g para as Au@SPIONs, com resultados de susceptibilidade magnética de $5,75 \times 10^{-5}$ emu/gOe e $1,7 \times 10^{-5}$ emu/gOe, respectivamente.

Na Figura 18 são apresentados os espectros de absorção por FT-IR do reagente redutor e estabilizador $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, das SPIONs sem e com estabilização, das Au@SPIONs e NTs.

Figura 18: Espectros de FT-IR das SPIONs, Au@SPIONs, NTs e $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

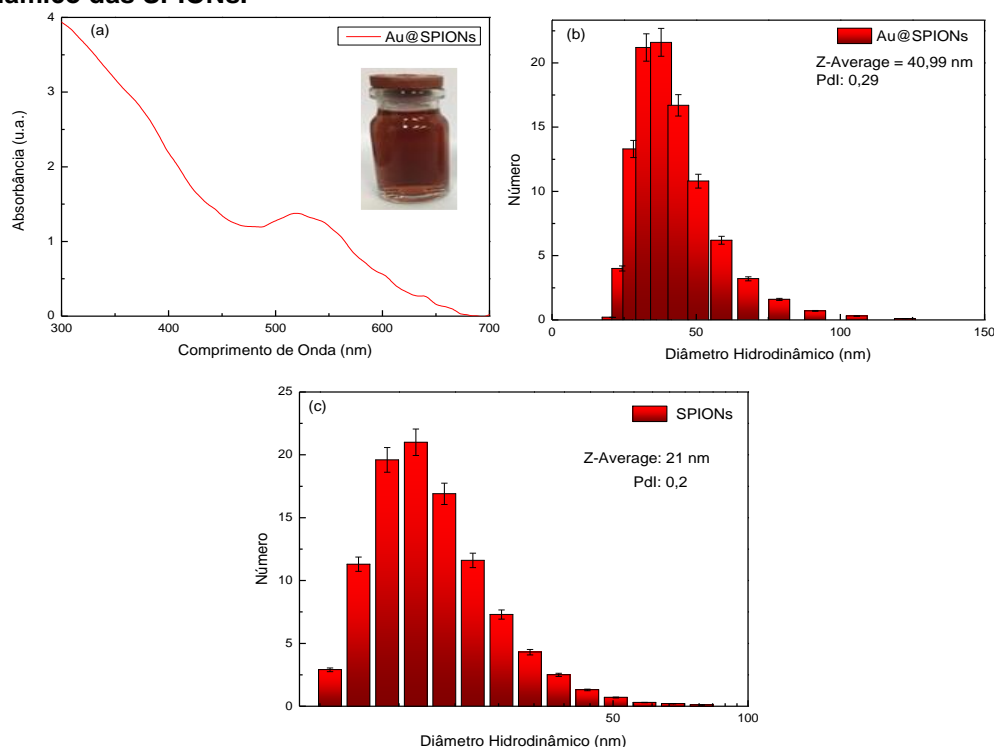


Fonte: Autor.

A quantificação de ferro foi determinada por meio da formação do complexo Fe(II)-ortofenantrolina, que apresenta absorbância máxima em 508 nm. As SPIONs utilizadas para o estudo da formação das nanopartículas *core-shell*, após quantificadas apresentaram concentração de Fe_3O_4 igual a 2,36 mg/mL. Para o estudo de recobrimento das SPIONs, inicialmente foi padronizada a concentração de solução

coloidal e de HAuCl_4 . Os melhores resultados encontrados para o recobrimento foram de HAuCl_4 na concentração de 0,5 mmol/L, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ na concentração de 62,5 mmol/L e de SPIONs a 0,5 mg/mL. O tempo de reação após a alteração da coloração da solução foi de 15 min, sendo a solução mantida em agitação até resfriar a temperatura ambiente. Na Figura 19a é apresentado os espectros de UV-visível das Au@SPIONs com uma banda centrada em 530 nm, na Figura 19 (b) o DLS das SPIONs recobertas com ouro, em número de partículas, com diâmetro de 40,99 nm, PDI 0,29 e potencial Zeta um valor de -51,6 mV, permanecendo na região de estabilidade. Com o intuito de confirmar o recobrimento das SPIONs, na Figura 19 (c) é mostrado o DLS em número de partículas das SPIONs na concentração de 0,5 mg/mL que foram utilizadas para a formação das nanopartículas *core-shell*, sendo observado um diâmetro hidrodinâmico de 21 nm e Pdl igual a 0,18.

Figura 19: Caracterização: (a) Espectro de absorção das Au@SPIONs na região do UV-Visível, (b) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das Au@SPIONs e (c) Distribuição de diâmetro hidrodinâmico das SPIONs.

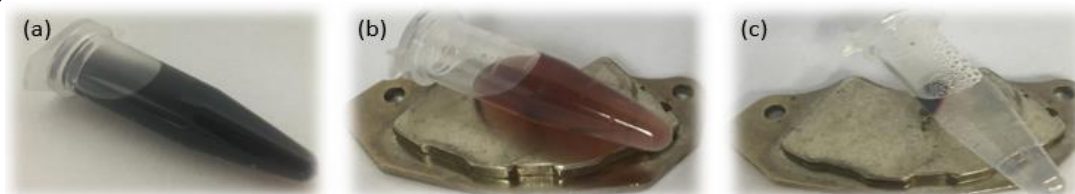


Fonte: Autor.

Na Figura 20, pode-se observar as SPIONs de cor preta e as Au@SPIONs com coloração avermelhada. Após o recobrimento com ouro a ressonância plasmônica de

superfície presente em nanopartículas de ouro foi evidenciada (Figura 19a). Entretanto, a magnetização/formação das Au@SPIONs foi confirmada, pois quando expostas ao campo magnético externo o sobrenadante ficou transparente.

Figura 20: Imagens fotográficas: (a) SPIONs evidenciando a coloração preta; (b) Au@SPIONs, de coloração vermelha; (c) sedimentação forçada das Au@SPIONs com aplicação de campo magnético externo.

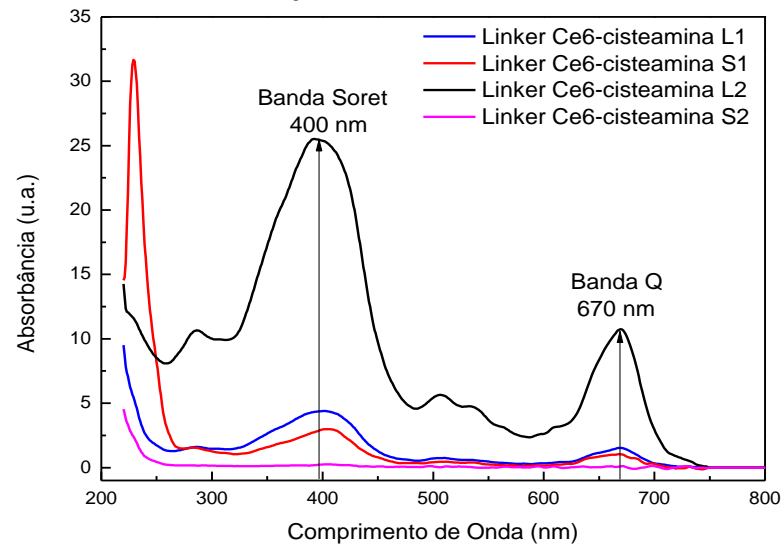


Fonte: Autor.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS CE6-CISTEAMINA E NANOSSONDA TERANÓSTICA

O complexo Ce6-cisteamina foi produzido por meio da química carbodiimida, no qual há a ligação entre os grupos carboxílicos com aminas primárias. Na Figura 21 é apresentado a caracterização deste complexo por Espectroscopia UV-visível, contendo os espectros de absorção após os processos de purificação via centrifugação, sendo o Linker L1 referente ao primeiro processo de centrifugação e S1, o primeiro sobrenadante, e L2 e S2 referente ao segundo processo de purificação. O Linker Ce6-cisteamina L2 apresentou a Banda de Soret próxima de 402 nm e Banda Q em 670 nm, o que confirma a formação do complexo.

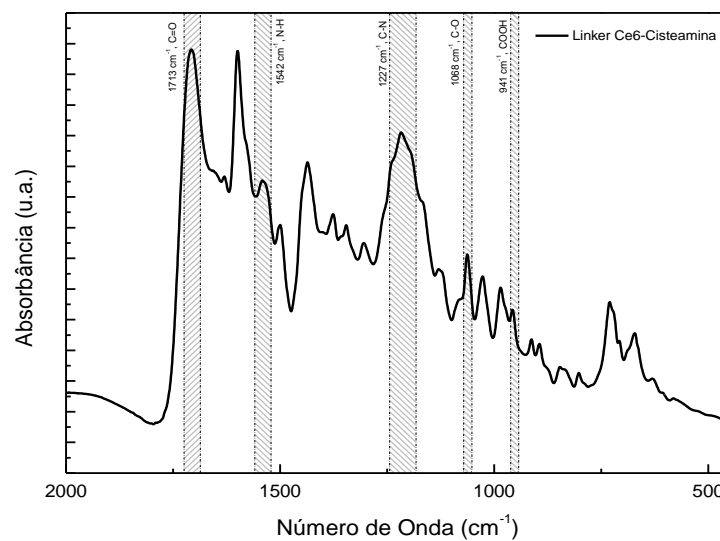
Figura 21: Espectro UV-visível dos complexos Ce6-cisteamina.



Fonte: Autor.

Na Figura 22 é apresentado os espectros de FT-IR do complexo Ce6-cistamina que foi produzido por meio dessa reação, com a presença dos modos vibracionais das bandas 941 cm^{-1} (COOH), 1068 cm^{-1} (C-O) 1227 cm^{-1} (C-N), 1542 cm^{-1} (N-H) e 1713 cm^{-1} (C=O), que confirmam a formação do complexo com o FS Ce6.

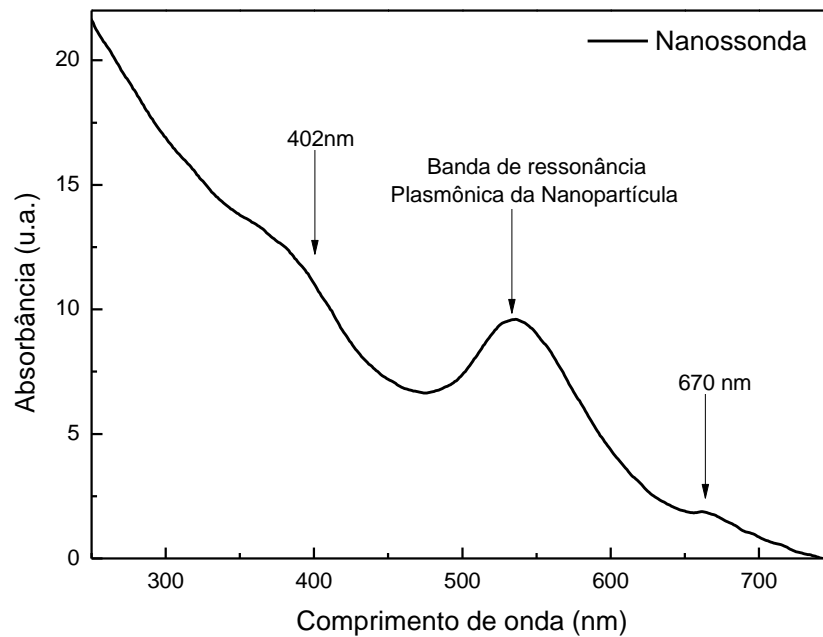
Figura 22: Espectro de FT-IR do complexo Ce6-cisteamina.



Fonte: Autor.

A funcionalização das Au@SPIONs com os complexos Ce6-cisteamina e EGF- α -LA resultou formação das Nanossondas Teranósticas. A Figura 23 mostra os espectros de UV-visível, sendo observado a presença da banda ressonante centrada em 402 nm (Banda de Soret) e em 670 nm (Banda Q) referente ao FS. Para a caracterização e quantificação da Ce6, a banda Q corresponde a região de interesse.

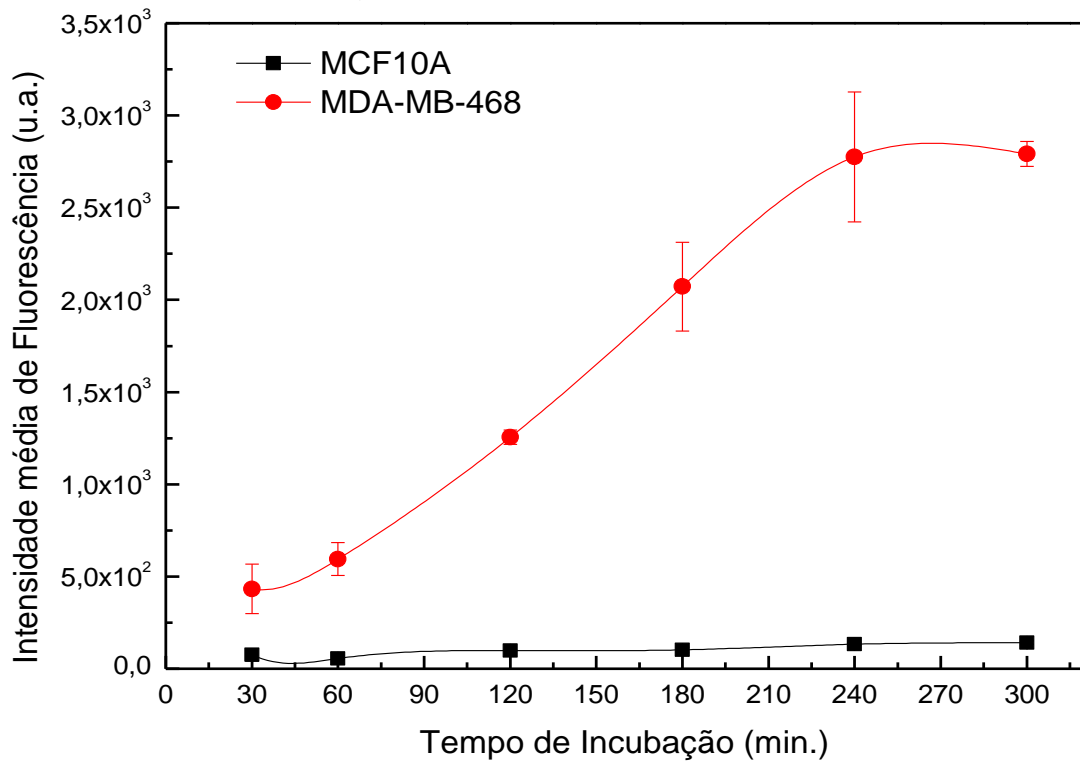
Figura 23: Caracterização por espectroscopia UV-visível das NTs com o complexo Ce6-cisteamina.



Fonte: Autor.

Na Figura 24 é mostrado o tempo de internalização das Nanossondas Teranósticas nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, com tempos de incubação de 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min.

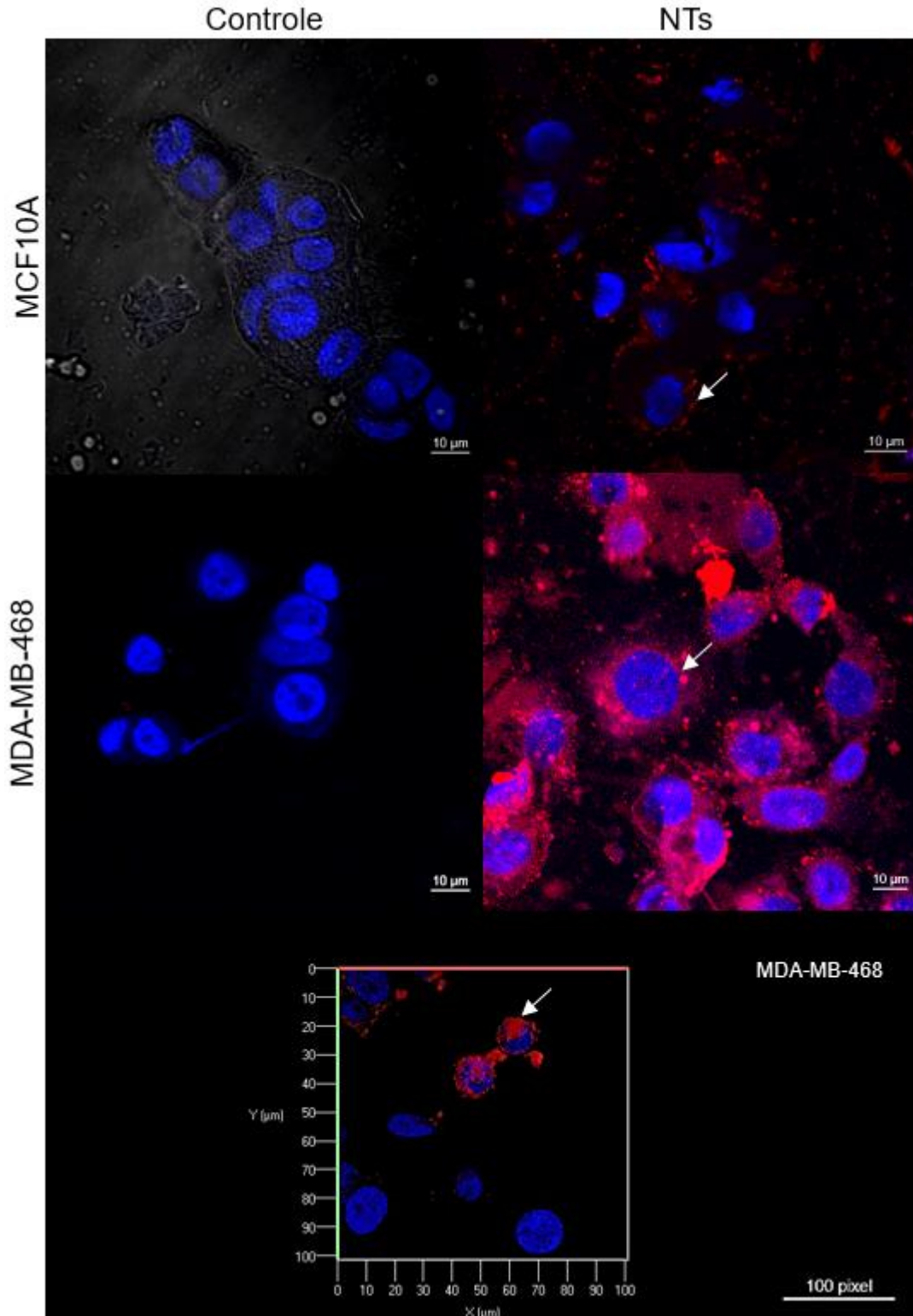
Figura 24: Análise do tempo de incorporação da NTs nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, com tempos de incubação de 30, 60, 120, 180, 240 e 300 min.



Fonte: Autor.

As internalizações das Nanossondas Teranósticas com o com complexos EGF- α -ácido lipóico e Ce6-cisteamina, bem como e da mistura de Au@SPIONs com Ce6 foram investigadas por meio da análise de Microscopia Confocal, na linhagem celular MDA-MB-468 e MCF10A conforme apresentado na Figura 25. Nestas imagens, o corante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) foi utilizado para marcar o núcleo celular com a coloração azul, devido a afinidade química na região A-T do DNA. A presença da NTs no citoplasma é marcada pela fluorescência do complexo Ce6, de coloração vermelha. Como resultado, a combinação destas fluorescências permite avaliar a incorporação das NTs, indicado pelas setas brancas e sua localização no citoplasma celular.

Figura 25: Micrografia da linhagem celular MDA-MB-468 e MCF10A para a análise de internalização das NTs. A coloração azul revela a fluorescência do DAPI ligado ao DNA no núcleo da célula e a vermelha é referente a fluorescência das NTs no citoplasma da célula. As colunas, da esquerda para a direita, indicam DAPI isolado e mesclagem, respectivamente. Uma imagem do corte da amostra de Nanossonda Teranóstica na linhagem MDA-MB-468 (100 pixel). Todos os experimentos foram realizados com um tempo de incubação de 2 h. As micrografias foram capturadas em um Microscópio Confocal, com barras de escala de 10 μm .



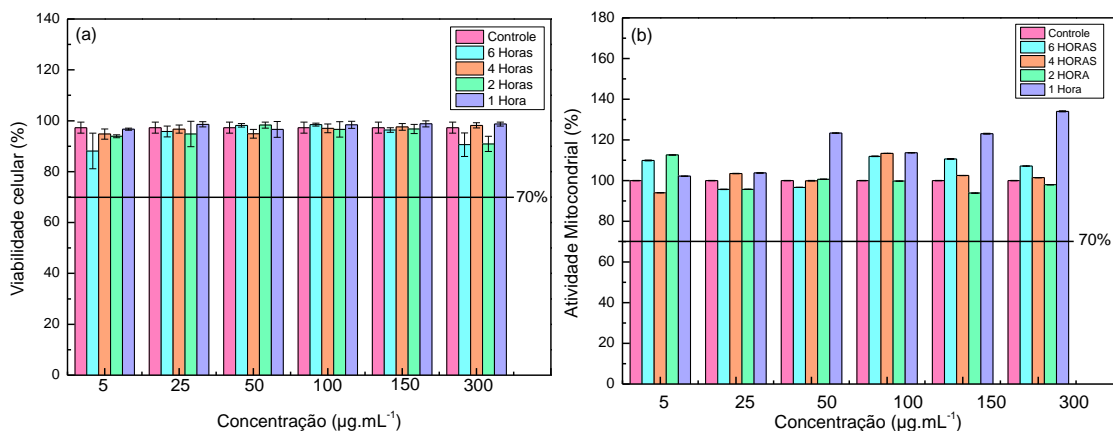
Fonte: Autor.

Como foi possível observar na Figura 25 as NTs apresentaram internalização no citoplasma e no núcleo de algumas células da linhagem celular MDA-MB-468, sendo essa confirmação obtida por meio da imagem do corte da amostra de Nanossonda Teranóstica (100 pixel). Na linhagem celular MCF10A as NTs também internalizam no citoplasma, entretanto observa-se uma menor intensidade de fluorescência quando comparado com a linhagem celular MDA-MB-468, permanecendo a maioria ao redor da membrana celular.

4.3 TESTE DE CITOTOXICIDADE

Os testes de citotoxicidade das SPIONs estabilizadas com citrato de sódio na linhagem celular MDA-MB-468 e MCF 10A foram realizados pelo método de exclusão do azul de tripan e pela atividade mitocondrial. A Figura 26 mostra a citotoxicidade das SPIONs na linhagem celular MDA-MB-468. Nota-se que em ambas as metodologias, as SPIONs não apresentaram taxas significativas de citotoxicidade nas concentrações de 5 a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, com tempo de até 6 h de incubação.

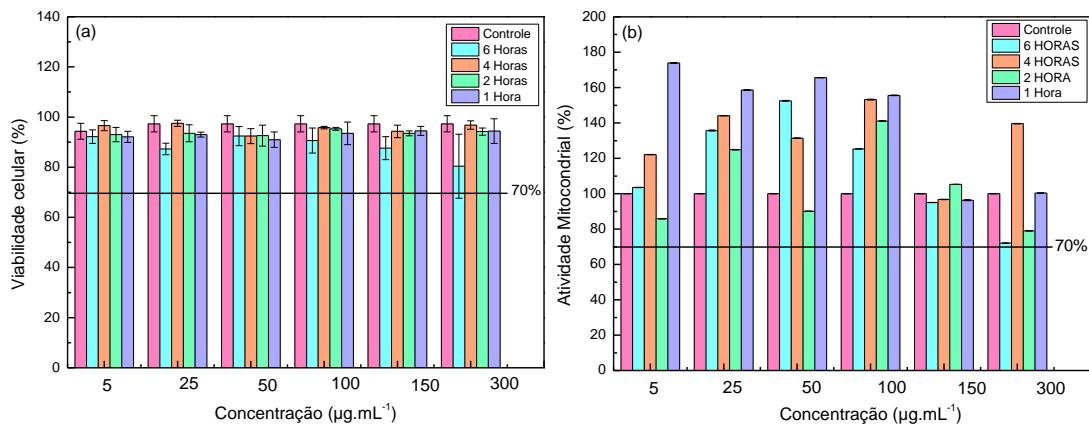
Figura 26: Análise de Viabilidade Celular (a) e Atividade Mitocondrial (b) na linhagem celular MDA-MB-468.



Fonte: Autor.

A Figura 27 mostra a citotoxicidade das SPIONs na linhagem celular MCF 10A, sendo verificado um comportamento semelhante à da linhagem MDA-MB-468. As SPIONs também não apresentaram citotoxicidade na linhagem normal, sendo um resultado extremamente importante para testes *in vivo*.

Figura 27: Análise de Viabilidade Celular (a) e Atividade Mitocondrial (b) na linhagem celular MCF 10A.



Fonte: Autor.

4.4 MONTAGEM E CARACTERIZAÇÃO DA CÂMARA DE IRRADIAÇÃO PARA TFT

Nesta tese foi feita a montagem de uma câmara de irradiação, com uma placa Arduino, um display de LCD e LEDs de alta potência com emissão infravermelho. As especificações técnicas dos LEDs são: 3 Watt; emissão em 808 nm; voltagem DC entre 1.6-2.2V; corrente DC de 700mA; ângulo de emissão entre 120-140°; e diâmetro de 20 mm. As peças foram feitas em impressora 3D e o controle de potência por meio da programação de uma placa Arduino. A Figura 28 apresenta as imagens da câmara de irradiação no processo de montagem, bem como finalizada.

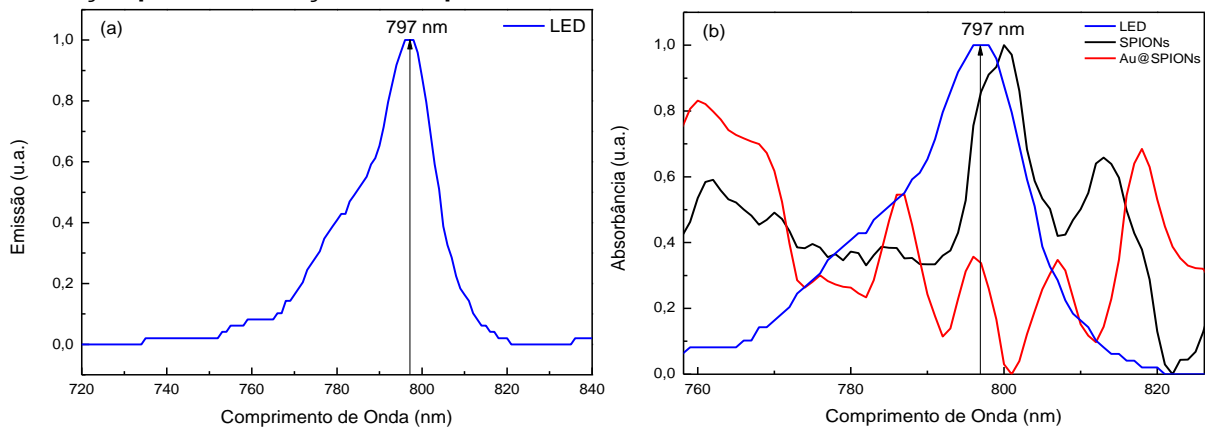
Figura 28: Montagem da câmara de irradiação para a realização dos experimentos de TFT nas linhagens células MDA-MB-468 e MCF10A.



Fonte: Autor.

O LED foi caracterizado em um Espectrômetro UV-Visível (DeNovix DS-11), na região de 190-840 nm com resolução espectral de 1 nm. Os espectros foram adquiridos pela emissão de radiação do LED no compartimento de amostra, sendo o resultado plotado com o auxílio do OriginPro versão 8.5.1. A Figura 29a apresenta o resultado da caracterização desse LED, podendo determinar a banda de emissão centrada na região de 795-797 nm. Embora o valor seja um pouco inferior ao informado pelo fabricante, as SPIONs e Au@SPIONs possuem absorção na região de emissão, conforme apresentado na Figura 29b.

Figura 29: Caracterização por Espectroscopia UV-Visível do LED utilizado na câmara de irradiação para a realização dos experimentos de TFT.



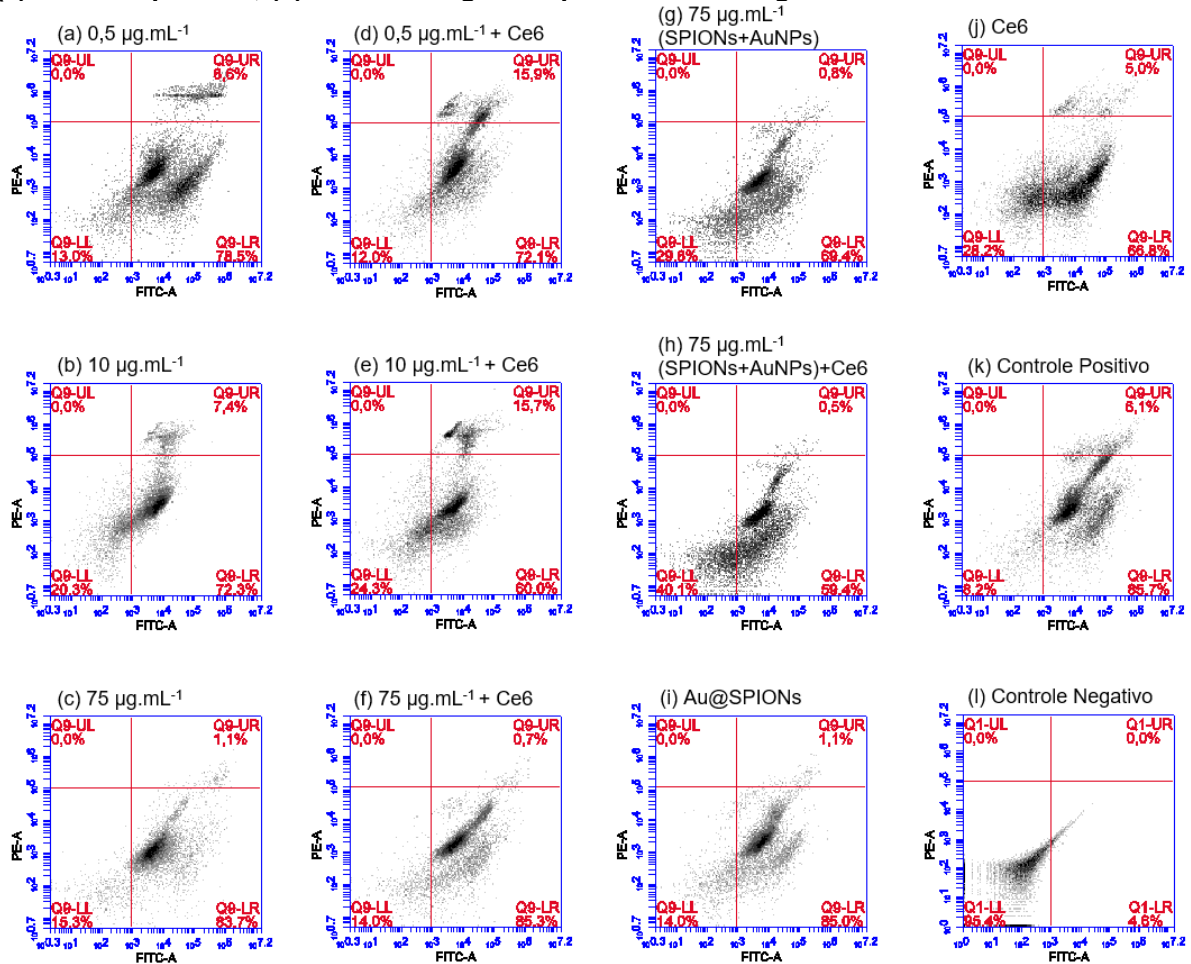
Fonte: Autor.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TIPO DE MORTE

A TFT foi realizada *in vitro* em linhagem de câncer de mama triplo negativo (TNBC), que é um tipo de câncer muito agressivo em virtude da ausência de receptores de estrogênio ou progesterona (ER ou PR). O TNBC possui poucas opções de tratamento e tem o pior prognóstico, tornando-se uma boa opção de tratamento alternativo.

A análise quantitativa por Citometria de fluxo investigou o tipo de morte após TFT de SPIONs, bem como as Au@SPIONs e mistura de SPIONs com AuNPs sem e com Ce6 na linhagem celular MDA-MB-468. O ensaio foi realizado em um tempo de incubação de 2h com SPIONs nas concentrações de 0,5; 10 e 75 µg/ mL, Ce6 na concentração de 1,2 µg/mL, AuNPs na concentração de 75 µg/mL e Au@SPIONs na concentração de 75 µg/mL. A Figura 30 mostra que as nanopartículas com TFT têm um efeito citotóxico na linhagem celular MDA MB-468, através dos resultados de morte celular utilizando a coloração de AnnV e PI, em viáveis (Quadrante – LL) (AnnV-PI-), apoptóticas (Quadrante – LR) (AnnV+ PI-) e necrose (Quadrante – UR) (AnnV+ PI+). Dois grupos de controles foram preparados para determinar um controle positivo (Figura 30k) e um controle negativo (Figura 30l) para determinar o tipo de morte celular. No controle negativo (Figura 30l) as porcentagens do tipo de morte não foram significativas, indicando 90,4% de células viáveis.

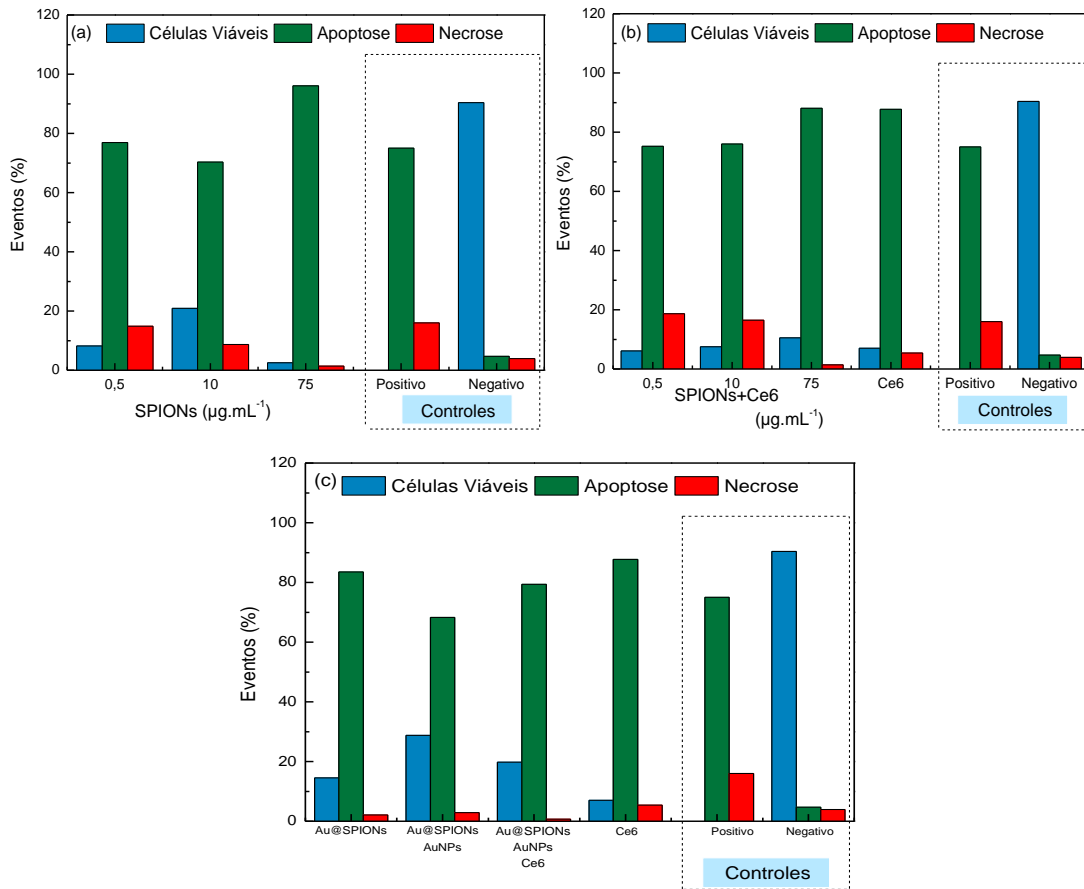
Figura 30: Análise de tipo de morte de SPIONs nas concentrações, após TFT:(a) 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (b) 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (c) 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; SPIONs+Ce6: (d) 0,5 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (e) 10 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (f) 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ com Ce6 (1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$); SPIONs+AuNPs, ambas nanopartículas na concentração de 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$ sem Ce6 (1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) (g) e com Ce6 (1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$) (h); Au@SPIONs: (i) 75 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; Ce6: (j) 1,2 $\mu\text{g. mL}^{-1}$; (k) Controle positivo; (l) Controle negativo após PTT na linhagem celular MDA-MB-468.



Fonte: Autor.

Para um melhor entendimento, os resultados do número de células viáveis, necrose e apoptose obtido por Citometria de fluxo foram graficados. O gráfico de barras da Figura 31a apresenta os resultados dos grupos controle e SPIONs, Figura 31b os resultados dos grupos controle e SPIONs+Ce6 e Figura 31c os resultados dos grupos controle, Au@SPIONs, SPIONs+AuNPs, SPIONs+AuNPs+Ce6 e Ce6.

Figura 31: Gráfico resumo das dispersões apresentadas na Figura 30. Análise de tipo de morte na linhagem celular MDA-MB-468 após TFT por Citometria de fluxo: (a) grupos controle e SPIONs; (b) grupos controle e SPIONs+Ce6 e (c) grupos controle, Au@SPIONs, SPIONs+AuNPs, SPIONs+AuNPs+Ce6 e Ce6.



Fonte: Autor.

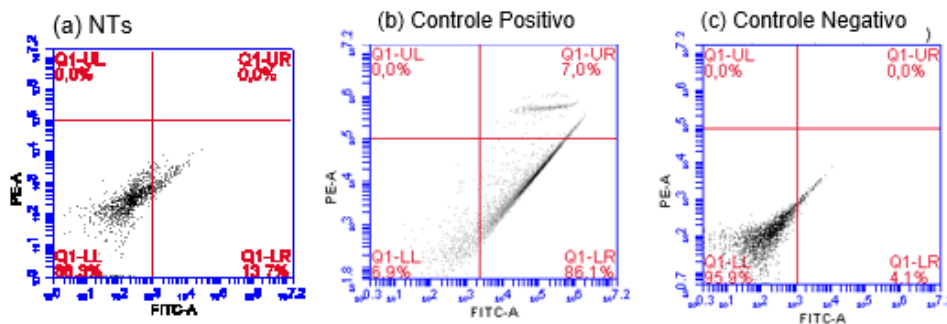
Pela análise quantitativa, Citometria de fluxo, foi observado morte celular em todas as concentrações de SPIONs, bem como na presença de Au@SPIONs, Ce6 livre, de mistura entre SPIONs+Ce6, SPIONs+AuNPs, e SPIONs+AuNPs+Ce6, com predominância no tipo de morte por apoptose. Nos controles positivo e negativo, a ação solo do TFT não causou morte significativa para o controle negativo (somente TFT) e a ação do DMSO na presença de TFT causou 100% de morte no controle positivo.

A análise quantitativa por Citometria de fluxo também investigou a viabilidade celular de Nanossondas Teranósticas nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A. O ensaio foi realizado em um tempo de incubação de 2h com NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 32 mostra que as NTs não proporcionam efeito

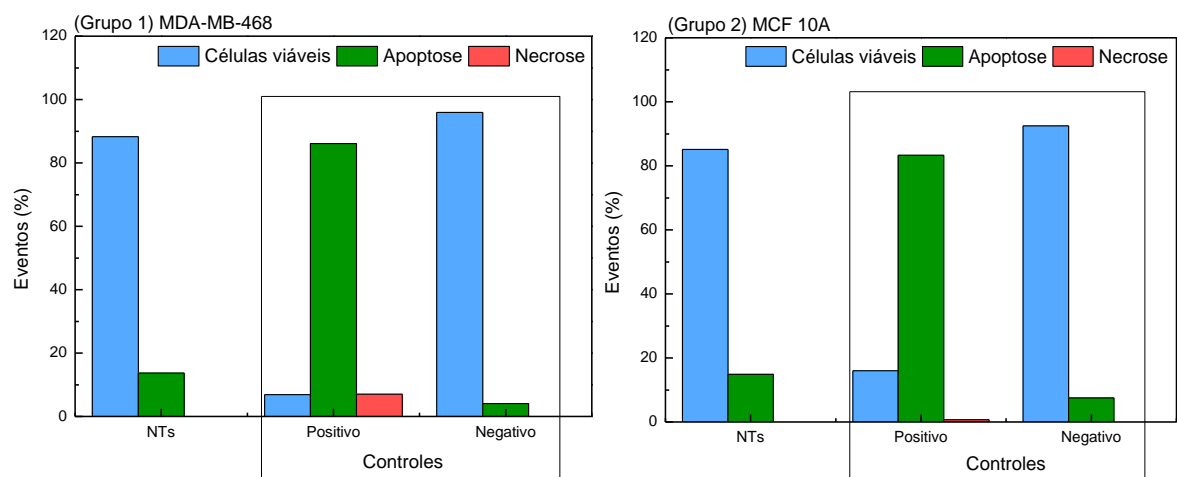
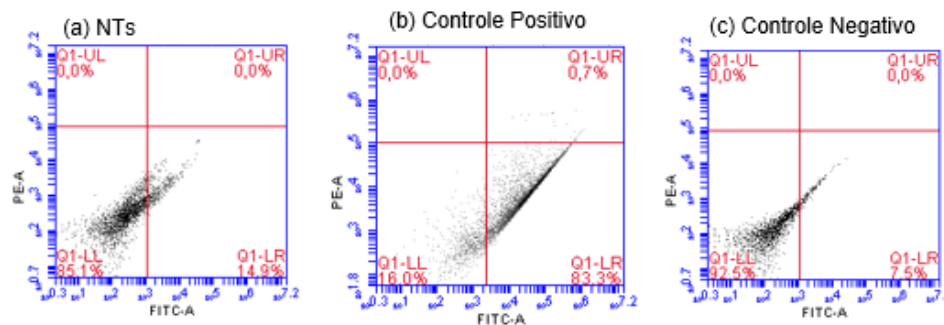
citotóxico nas linhagens celulares na ausência de terapia, sendo esse resultado resumido pelo gráfico de barras.

Figura 32: Análise de viabilidade celular de NTs na concentração de 2 µg/mL para as linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, sendo os grupos (1) viabilidade celular da linhagem celular MDA-MB-468, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo; Grupo (2) viabilidade celular da linhagem celular MCF 10A, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo.

Grupo 1 - viabilidade celular da linhagem celular MDA-MB-468



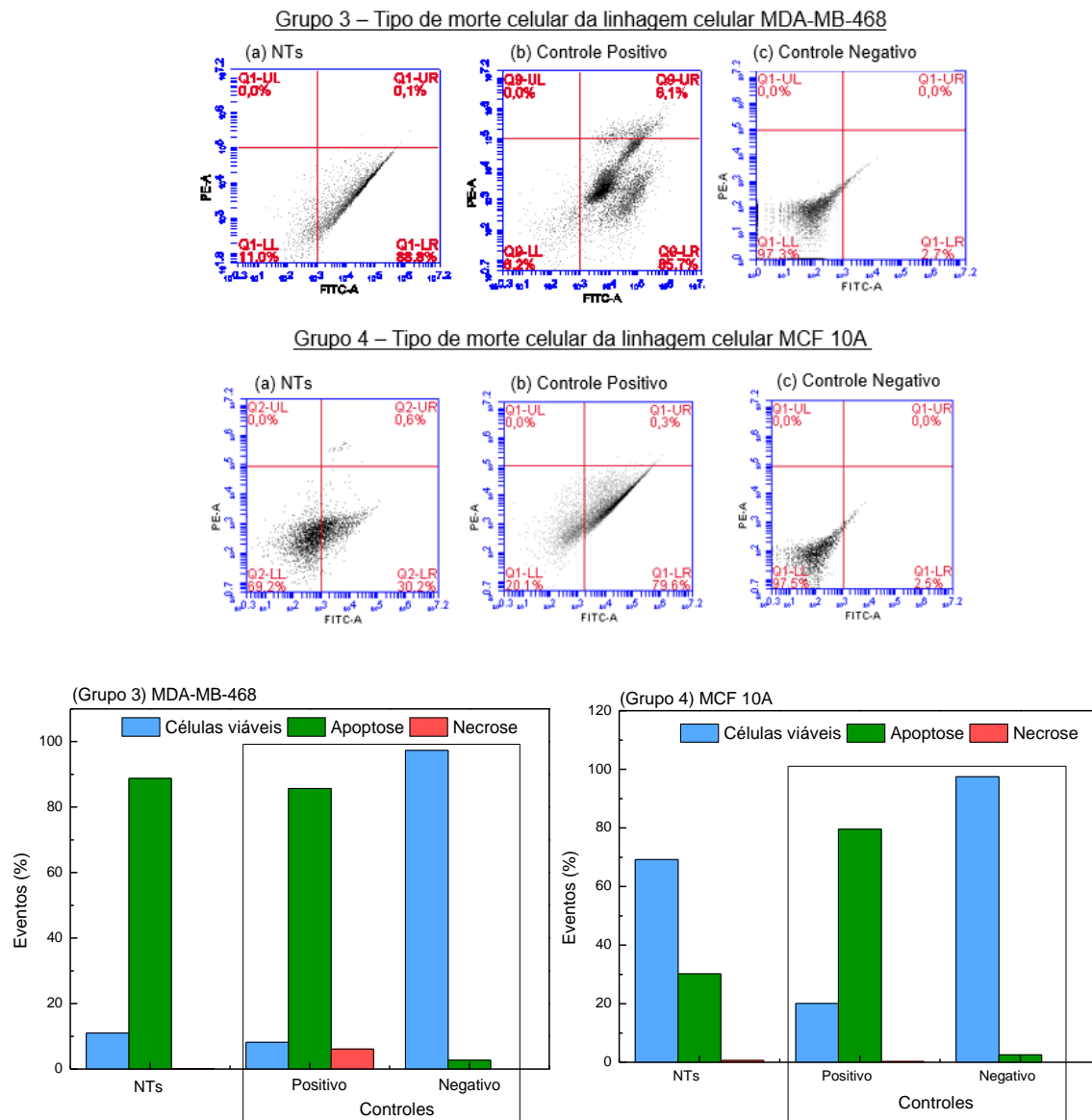
Grupo 2 - viabilidade celular da linhagem celular MCF 10A



Fonte: Autor.

O tipo de morte após TFT de NTs nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A também foi analisado por Citometria de fluxo. O ensaio foi realizado em um tempo de incubação de 2h com NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 33 mostra que as NTs proporcionam efeito citotóxico com porcentagens significativas de morte por apoptose na linhagem celular MDA-MB-468 após TFT, sendo esse resultado resumido pelo gráfico de barras.

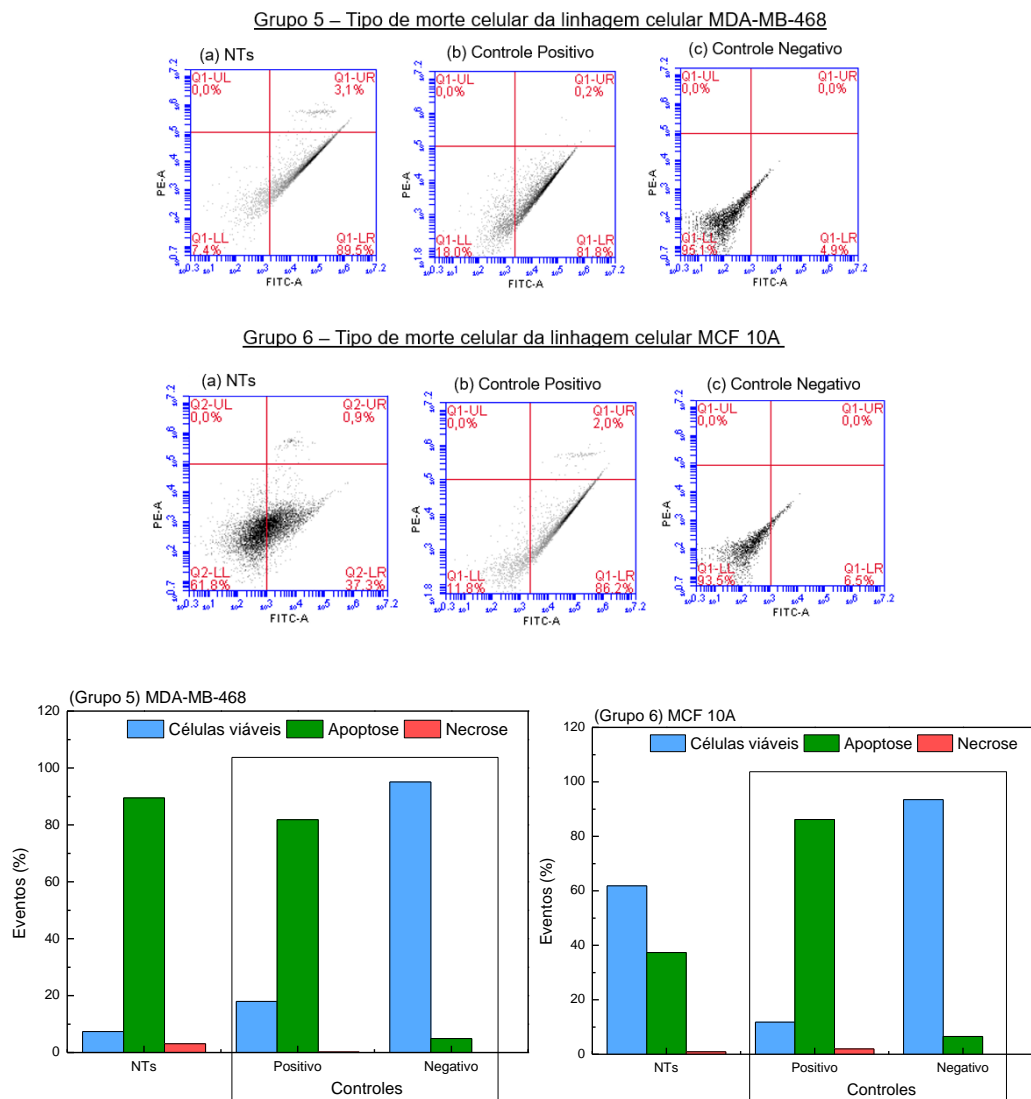
Figura 33: Análise do tipo de morte por TFT de NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, sendo os grupos (3) Tipo de morte celular na linhagem celular MDA-MB-468, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo; Grupo (4) Tipo de morte celular na linhagem celular MCF 10A, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo.



Fonte: Autor.

O tipo de morte após TFD de NTs (2 $\mu\text{g/mL}$) nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A também foram investigados na análise quantitativa por Citometria de fluxo. O ensaio foi realizado em um tempo de incubação de 2h com NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$. A Figura 34 mostra que as NTs não proporcionam efeito citotóxico nas linhagens celulares na ausência de terapia, entretanto quando as linhagens celulares tratadas por TFD ocorre uma porcentagem significativa de morte para a linhagem MDA-MB-468, sendo esse resultado resumido pelo gráfico de barras.

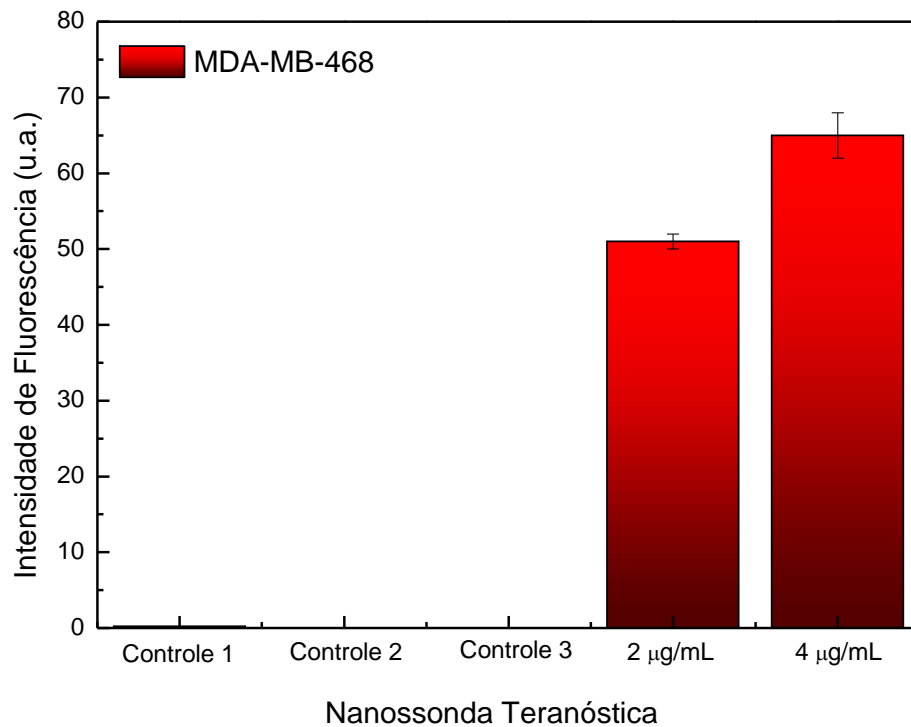
Figura 34: Análise do tipo de morte por TFD de NTs na concentração de 2 $\mu\text{g/mL}$ para as linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, sendo os (5) Tipo de morte celular na linhagem celular MDA-MB-468, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo; Grupo (6) Tipo de morte celular na linhagem celular MCF 10A, com (a) NTs, (b) Controle positivo e (c) Controle Negativo.



Fonte: Autor.

Na Figura 35 é mostrado o efeito da TFD associada as NTs nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$ para a produção de ERO's na linhagem celular MDA-MB-468. Sendo analisado controles com células tratadas apenas com luz, com NTs e sem nenhum tipo de tratamento.

Figura 35: Análise das espécies reativas de oxigênio (ERO's) na linhagem celular MDA-MB-468 após TFD, com NTs nas concentrações de 2 e 4 $\mu\text{g/mL}$. O controle 1 mostra os resultados (células tratadas apenas com luz), controle 2 (células apenas com NTs) e controle 3 (células sem nenhum tratamento).



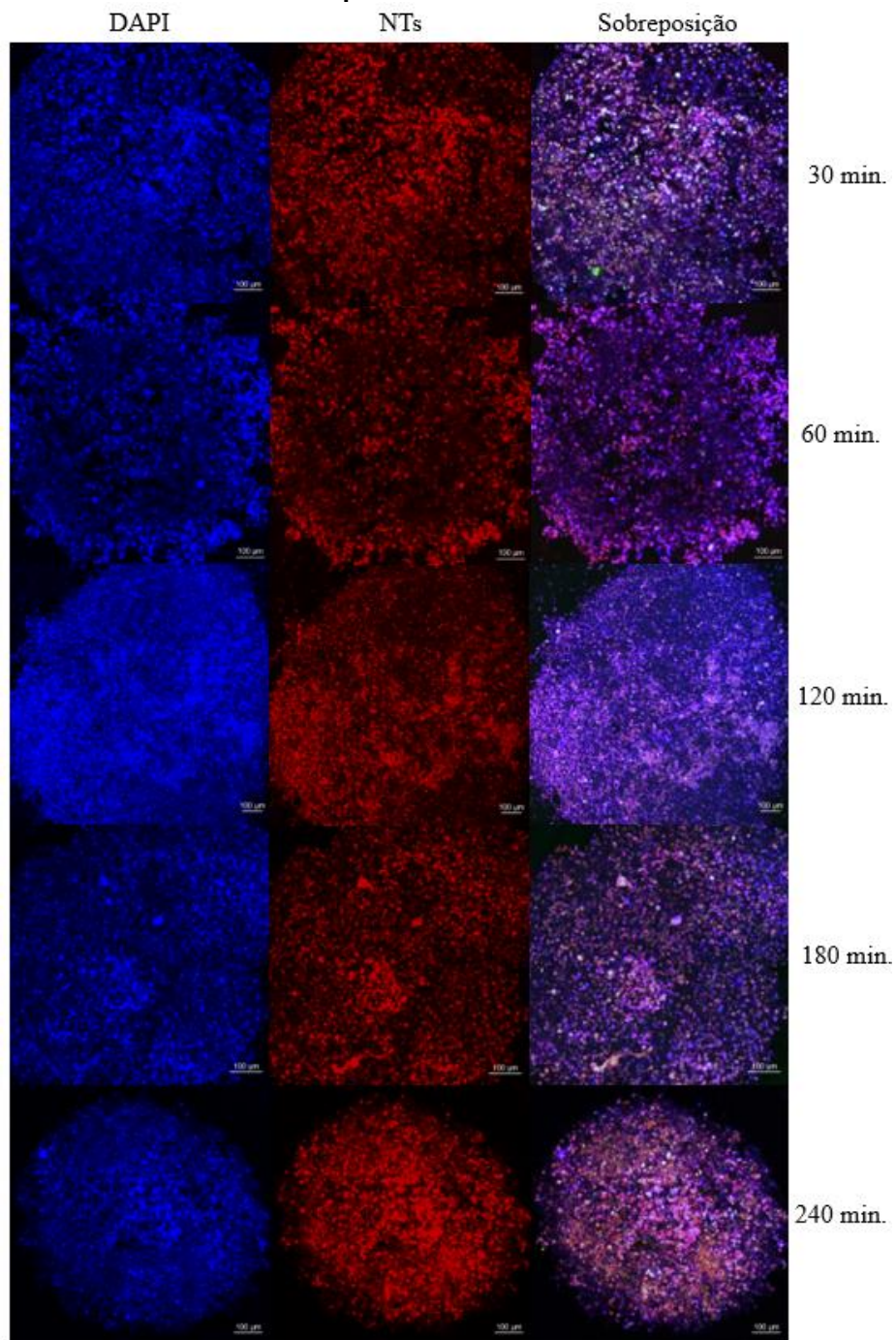
Fonte: Autor.

4.6 ESTUDO INICIAL COM MODELO 3D DA LINHAGEM CELULAR MDA-MB-468

A análise de Microscopia de fluorescência confocal (Figura 35) foi realizada para confirmar a internalização das NTs com um tempo de incubação de 30 min., 60 min., 120 min., 180 min. e 340 min., sendo a coloração em azul mostrando a fluorescência

do DAPI ligado ao DNA no núcleo da célula e a coloração vermelha é referente a fluorescência das NTs no citoplasma da célula.

Figura 366: Micrografia do modelo 3D (linhagem celular MDA-MB-468) para análise de internalização das NTs. A coloração azul revela a fluorescência do DAPI ligado ao DNA no núcleo da célula e a coloração vermelha é referente a fluorescência das NTs no citoplasma da célula. As colunas, da esquerda para a direita, indicam DAPI isolado, NTs e sobreposição das imagens respectivamente. Os experimentos foram realizados com um tempo de incubação de 30 min., 60 min., 120 min., 180 min. e 340 min. As micrografias foram capturadas em um Microscópio Confocal, com barras de escala de 100 μm .



Fonte: Autor.

5. DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa que deriva de alterações genéticas. Por ser um câncer metastático, tende a se espalhar para outras partes do corpo como ossos, fígado, pulmão e cérebro, o que dificulta seu tratamento. Além disso, o câncer de mama pode ser classificado em subgrupos moleculares que possuem diferentes expressões de receptores do câncer, como luminal A, luminal B, claudin-low e basal-like, entretanto, o câncer de mama triplo negativo (TNBC) que é foco desta tese, tem como característica ser uma doença heterogênea e agressiva, que possui mau prognóstico, altas taxas de metástase, elevados índices mitóticos, superexpressão de EGFR e ausência de expressão de ER, PR e HER-2, além de poucas alternativas de tratamentos. Neste contexto, nesta tese a aplicação de SPIONs, Au@SPIONs, bem como as NTs permitiram resultados promissores para a área de diagnóstico e de terapia para o TNBC.

Primeiramente, as SPIONs foram sintetizadas pelo método de coprecipitação química (MASSART, 1981; MÉRIDA *et al.*, 2015), sendo observado que as SPIONs apresentaram interação com o campo magnético externo aplicado (ímã de Neodímio) e coloração preta. A análise de DLS determinou o diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersividade das SPIONs sem processos de estabilização (Figura 7a), sendo encontrado um diâmetro médio de 1,28 μm . Após o processo de estabilização com citrato de sódio (Figura 7b) o DLS mostrou que os íons de citrato melhoram a distribuição de tamanho e preserva as dimensões do material na nanoescala, mostrando valores de 69,70 nm. Além disso, a solução coloidal permaneceu estável com valor de potencial Zeta de -48,6 mV e em meio com pH 8.

A morfologia e a distribuição do diâmetro médio das SPIONs também foram determinadas por meio das micrografias de SEM (Figura 8 e 9a/b), sendo possível observar que após a estabilização das SPIONs com citrato de sódio, a morfologia das nanopartículas foram melhores identificadas. As micrografias obtidas por SEM e TEM mostraram diferença significativa no diâmetro das SPIONs, quando comparadas com a análise de DLS no modo de intensidade de luz espalhada. Por SEM foi encontrado um diâmetro físico médio de $13,15 \pm 0,25$ nm (Figura 8) e por TEM $7,20 \pm 0,12$ nm (Figura 10), ambos informando a formação de partículas com diâmetros inferiores a 20 nm. Enquanto que pela análise de DLS no modo de intensidade de luz espalhada (Figura 7b) o diâmetro hidrodinâmico foi de 69,70 nm e Pdl 0,170.

As técnicas de TEM ou SEM-FEG e DLS apesar de serem complementares apresentaram uma diferença nos diâmetros das SPIONs. Tal alteração ocorre em razão da análise SEM informar valores de diâmetro das nanopartículas numa imagem real, sendo possível obter informações de morfologia, bem como a identificação da presença ou ausência de agregados, ou seja, diferencia as partículas de forma individual. Enquanto o DLS obtém um diâmetro hidrodinâmico médio, por meio da intensidade de luz espalhada pelas partículas que estão movimento Browniano, sendo o resultado desta análise diretamente dependente a presença ou ausência de agregados (ROST *et al.*, 2020), de moléculas funcionalizadas em sua superfície e até mesmo pela interação magnética das partículas (YOUHANNAYEE *et al.*, 2019).

A morfologia esférica das Au@SPIONs também foi identificada por TEM (Figura 11) em campo claro sendo identificado a formação do *core-shell* por meio dos resultados de EDS (Figura 12c/d), que sendo uma técnica analítica permite a caracterização da composição química de materiais (STRICKLER; ESCUDERO-ESCRIBANO; JARAMILLO, 2017; WILLIAM e CARTER, 2009). No Spectrum 1 foi identificado apenas a presença do elemento químico Fe, enquanto no Spectrum 2 a presença de Au e Fe, já a presença de cobre deve-se à grade na qual a amostra foi depositada. Como o processo de síntese das nanopartículas híbridas inicia-se com SPIONs sintetizadas e estabilizadas, observou-se pela Figura 12e a presença de SPIONs que não foram recobertas.

A análise da estabilidade coloidal das SPIONs alterando-se os valores de pH do meio foi apresentado na Figura 13. De acordo com essa curva, foi observado que em meios de pH neutro para alcalino, as SPIONs apresentaram uma banda característica centrada em 300 nm. De acordo com DE GÓIS *et al.* (2019), nanopartículas formadas por Fe₃O₄ apresentam um padrão de absorção entre 200 e 600 nm, devido às transições de seu orbital d (DE GÓIS *et al.*, 2019). Já RADÓN *et al.* (2017) relataram que as nanopartículas de Fe₃O₄ apresentam banda de absorção na região de 330 – 450 nm (RADÓN *et al.*, 2017) e ABDULLAH *et al.* (2020) relacionaram a banda de absorção próxima de 350 nm como corresponde à presença de Fe₃O₄ (ABDULLAH *et al.*, 2020). Sendo assim, é possível sugerir que houve a formação do óxido Fe₃O₄ nas SPIONs.

Quando as SPIONs foram expostas à meios ácidos, apresentaram no espectro UV-visível um aumento de absorção nas regiões menos energéticas, e a desestabilização da solução pôde ser vista visualmente em virtude da sedimentação

das nanopartículas. Por outro lado, em meio alcalino, não foi observado esse aumento de banda no espectro e nem desestabilização da solução. A estabilidade coloidal também foi analisada por meio do diâmetro hidrodinâmico e o potencial Zeta em função do pH do meio (Figura 14). Quando em meio ácido, as SPIONs são desestabilizadas e, como consequência, seu diâmetro hidrodinâmico aumenta. Em meios alcalinos, não há mudanças significativas em sua dimensão. Portanto, as SPIONs são encontradas apenas na região de estabilidade com valores de pH acima de 6.

O resultado da estabilidade coloidal está de acordo com KRUKOWSKI *et al.* (2017), que afirmam que moléculas de ácido cítrico e sais de citrato em soluções aquosas podem sofrer processos de dissociação e hidrólise para atingir o equilíbrio, porém, sabe-se que esses processos são dependentes da concentração do soluto, pH e temperatura da solução. Essas moléculas, quando submetidas a meios ácidos, tendem a ter uma maior formação de grupos hidroxila, devido aos cátions H^+ na solução. No meio alcalino não há formação desses grupos, tendendo a molécula a permanecer aniônica (KRUKOWSKI *et al.*, 2017). Uma vez que as SPIONs foram estabilizadas por citrato de sódio, toda esta explicação confirma os valores de potencial Zeta obtidos experimentalmente.

Pela análise de DRX (Figura 15) foi confirmado que as SPIONs após sintetizadas são formadas pelos óxidos de ferro Fe_3O_4 , $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ e $\alpha\text{-}Fe_2O_3$, entretanto no pico de maior intensidade foi identificado apenas a Fe_3O_4 , que infere uma maior porcentagem desse tipo de óxido na amostra, sugerindo que as nanopartículas são superparamagnéticas. De acordo com LAGROW *et al.*, (2019), o mecanismo de reação pelo método de coprecipitação ainda necessita de melhores estudos, devido a formação dos óxidos intermediários, que dificultam a reprodutibilidade das sínteses, porém, sabe-se que as principais fases obtidas são Fe_3O_4 e $\gamma\text{-}Fe_2O_3$ (LAGROW *et al.*, 2019). PROKOPIU *et al.* (2021), também sintetizou SPIONs pelo método de coprecipitação e estabilizou com citrato de sódio, e de acordo com os dados de XRD, informou que suas nanopartículas apresentaram picos característicos em diferentes 2θ representados pelas direções cristalinas [hkl] correspondentes (220), (311), (400), (422), (511), (440) e (533) que foram atribuídas a $\gamma\text{-}Fe_2O_3/Fe_3O_4$ (PROKOPIU *et al.*, 2021).

As curvas de VSM de SPIONs sem/com estabilização mostrado na Figura 16 e das SPIONs e Au@SPIONs depositadas em lamínulas (Figura 17). O campo

magnético externo aplicado fez com que a amostra se tornasse magnetizada ao longo do tempo, fazendo com que os spins das nanopartículas se orientassem na direção do campo. A variação do campo magnético proporcionou a formação de uma corrente nas bobinas, que foram convertidas em informações sobre as propriedades magnéticas do nanomaterial. A magnetização das nanopartículas foi proporcional ao aumento do campo magnético externo, até se tornar constante (magnetização de saturação) que é o ponto máximo na curva. Ao alcançar a magnetização de saturação, ocorreu a diminuição do campo magnético até zero (valor nulo). Quando o campo magnético foi invertido, a amostra foi perdendo a magnetização (campo coercitivo) até que os spins estavam desordenados e com o campo magnético no sentido oposto, a magnetização foi atingida com o mesmo valor da magnetização de saturação, mas em módulo.

Na Figura 16, as SPIONs sem e com estabilização apresentam uma magnetização de saturação de 57 emu/g e 5,4 emu/g, com susceptibilidade magnética de $2,85 \times 10^{-3}$ emu/gOe e $2,7 \times 10^{-4}$ emu/gOe, respectivamente. Já as nanopartículas depositadas nas lamínulas (Figura 17), apresentaram uma magnetização de saturação de 1,15 emu/g para as SPIONs e 0,34 emu/g para as Au@SPIONs, com resultados de susceptibilidade magnética de $5,75 \times 10^{-5}$ emu/gOe e $1,7 \times 10^{-5}$ emu/gOe, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com a literatura, uma vez que as IONPs para fins biomédicos, devem apresentar valores altos de magnetização e susceptibilidade magnética, bem como perda de magnetização na ausência de campo magnético (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020).

Nos resultados das SPIONs foi observado a formação de um único domínio magnético, que é caracterizado por apresentar comportamento superparamagnético (CANAPARO *et al.*, 2020; SCHWAMINGER; BAUER; FRAGA-GARCÍA, 2021) e pode ser observado nas Figura 16 e Figura 17a. Por outro lado, as Au@SPIONs (Figura 17b), apresentaram uma magnetização de saturação inferior ao ponto máximo da curva, mas manteve o comportamento superparamagnético.

De acordo com AJINYA *et al.* (2020), as nanopartículas de Fe_3O_4 são superparamagnéticas, com diâmetros inferiores a 20 nm e, seu comportamento paramagnético ou superparamagnético é potencializado pela redução de tamanho. Conseqüentemente, observa-se uma diminuição do comportamento ferromagnético, devido à redução do estado de valência do ferro (AJINKYA *et al.*, 2020). É importante ressaltar, que as partículas menores que o diâmetro crítico também podem apresentar

um único domínio, com magnetização e orientação uniforme de um único spin sobre todo o volume da partícula (MOHAPATRA e LIU, 2018; SHABATINA *et al.*, 2020).

Os espectros de absorção por FT-IR do $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, das SPIONs sem e com estabilização, das Au@SPIONs e NTs foram apresentadas na Figura 18. A confirmação da estabilização da partícula por citrato de sódio ocorreu pela ausência de sedimentação, corroborando com o valor mensurado de potencial Zeta. A formação do óxido Fe_3O_4 foi confirmado pela análise de DRX, bem como pela presença da banda vibracional nas regiões entre 500 cm^{-1} a 635 cm^{-1} (STEIN *et al.*, 2020; ELBIALY; FATHY, KHALIL, 2015; SOOD *et al.*, 2015; DUSZYŃSKA *et al.*, 2020; KIRUBHA e RAJPUT, 2019; MEKSERIWATTANA *et al.*, 2019; NOSRATI *et al.*, 2019; PANDA *et al.*, 2019; PANDEY *et al.*, 2016; SEKAR *et al.*, 2017; VIKRAM *et al.*, 2016; RADOŃ *et al.*, 2017; PROKOPIOU *et al.*, 2021; SKLUTE *et al.*, 2018). Entretanto, a $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ também pode ser observada com bandas vibracionais na região de 560 cm^{-1} (DEMIR *et al.*, 2015; SKLUTE *et al.*, 2018), o que dificulta a identificação exata do óxido formado por este tipo de análise. As bandas vibracionais entre 1325 cm^{-1} a 1450 cm^{-1} e 1525 cm^{-1} a 1655 cm^{-1} , confirmaram a estabilização das nanopartículas com a molécula de citrato de sódio, pela presença das bandas vibracionais do grupo de ácido carboxílico desprotonado (COO^-) em 1397 cm^{-1} , e vibração simétrica do grupo carbonila (-C=O) em 1593 cm^{-1} (STEIN *et al.*, 2020; DUSZYŃSKA *et al.*, 2020; MEKSERIWATTANA *et al.*, 2019; RAJENDRAN e SENGODAN, 2017; PROKOPIOU *et al.*, 2021). 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} (DUSZYŃSKA *et al.*, 2020; ELBIALY; FATHY, KHALIL, 2015; SOOD *et al.*, 2015; PANDA *et al.*, 2019; KIRUBHA e RAJPUT, 2019).

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 recobrimento com ouro. As Au@SPIONs podem ser formadas por meio de uma solução de HAuCl_4 que inicialmente é mantida em agitação e aquecido até ebulição. Posteriormente, SPIONs e citrato de sódio são adicionados à solução de HAuCl_4 e a reação ocorre por 5 min, podendo-se observar a alteração da coloração da solução (GHORBANI *et al.*, 2015; ZHU *et al.*, 2018).

O espectro de UV-visível das Au@SPIONs (Figura 19a) mostrou a presença de uma banda de absorção centrada em 530 nm. O DLS das SPIONs recobertas com

ouro, em número de partículas (Figura 19b) mostrou um diâmetro hidrodinâmico de 40,99 nm, PDI 0,29 e potencial Zeta um valor de - 51,6 mV. Com o intuito de se comparar os dados de Au@SPIONs com SPIONs, na Figura 19c foi mostrado os resultados das SPIONs na concentração de 0,5 mg/mL que foram utilizadas para a formação das nanopartículas *core-shell*, sendo observado um diâmetro hidrodinâmico, em número de partículas de 21 nm e PDI de 0,20.

A formação das nanopartículas *core-shell* pode ser analisada visualmente por meio da alteração da coloração, da mudança das SPIONs com coloração preta (Figura 20a) para as Au@SPIONs com coloração avermelhada (Figura 20b). As Au@SPIONs também possuem magnetização, que foi confirmada pela exposição ao campo magnético externo (Figura 20c). Como as Au@SPIONs também apresentam uma ressonância plasmônica de superfície, que é característica de nanopartículas de ouro. A ausência de nanopartículas de ouro na solução foi determinada pela transparência do sobrenadante quando em contato com o ímã, bem como pela caracterização por Espectroscopia UV-visível.

O complexo Ce6-cisteamina foi produzido por reação química carbodiimida, que acontece por meio da ligação entre grupos de ácido carboxílico (COOH) com aminas primárias (NH₂), sendo o produto da reação a ligação amida (C-N), com a liberação de H₂O (CASTILHO; HEWITT; RANIERO, 2017). Na Figura 21 foi mostrado a presença da Banda de Soret próxima de 402 nm e Banda Q em 670 nm. A Figura 22 mostrou a presença dos modos vibracionais das bandas 941 cm⁻¹ (COOH), 1068 cm⁻¹ (C-O), 1227 cm⁻¹ (C-N), 1542 cm⁻¹ (N-H) e 1713 cm⁻¹ (C=O), que confirmam a formação do complexo Ce6-Cisteamina. A Figura 23, por fim mostrou a funcionalização das Au@SPIONs com os complexos Ce6-cisteamina e EGF- α -LA, que resultou na formação das Nanossondas Teranósticas (NTs), com a presença da banda ressonante centrada em 402 nm (Banda de Soret) e em 670 nm (Banda Q) referente à Ce6.

O tempo de incorporação das NTs nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF 10A (Figura 24), mostrou que as NTs internalizam na linhagem celular MDA-MB-468 (com superexpressão de EGFR), entretanto esse comportamento não é observado na linhagem celular MCF 10A. De acordo com HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ e colaboradores (2020), a carga de superfície das nanopartículas está diretamente relacionada a sua distribuição pelo organismo. Nanopartículas com cargas neutras apresentam pouca interação com proteínas plasmáticas e tem um

tempo maior de permanência no organismo. Nanopartículas aniônicas possuem interação e internalizam por endocitose adsorviva. Enquanto, as de carga positiva são absorvidas rapidamente por atrações eletrostáticas, pois a membrana celular possui carga negativa (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ *et al.*, 2020). Na Figura 25, as NTs apresentaram internalização no citoplasma e no núcleo de algumas células da linhagem celular MDA-MB-468. A confirmação da internalização no núcleo foi obtida por meio da imagem do corte da amostra com NTs. As NTs na linhagem celular MCF 10A também internalizaram no citoplasma, entretanto com menor intensidade de fluorescência quando comparado com as NTs da linhagem celular MDA-MB-468.

Os testes de citotoxicidade das SPIONs estabilizadas com citrato de sódio na linhagem celular MDA-MB-468 (Figura 26) e MCF 10 A (Figura 27) foram realizados pelo método de exclusão do azul de tripan e pela atividade mitocondrial. O método colorimétrico com MTT avalia a viabilidade celular (NEPOMUCENO *et al.*, 2021; NANDI *et al.*, 2017), determinando a concentração mínima necessária para obtenção de 50 % de células viáveis ou inviáveis, com a quantificação da atividade de desidrogenase dos produtos da reação NADH ou NADPH, que reduz a atividade dos cristais de formazan do MTT em células vivas (NEPOMUCENO, *et al.*, 2021). De acordo com STANDARD (2009), a ISO 10993-5: 2009 (E) determina que a viabilidade celular pode ser determinada por meio da atividade metabólica. Se a viabilidade for menor que 70%, entende-se que existe um potencial citotóxico (STANDARD, 2009). Sendo assim, em ambas metodologias e linhagens as SPIONs não apresentaram taxas significativas de citotoxicidade, quando em concentrações de 5 a 300 µg/mL, com tempo de até 6 h de incubação.

O processo de montagem de um equipamento (câmara de irradiação) que foi utilizado para TFT foi apresentado na Figura 28. O LED utilizado foi caracterizado por um Espectrômetro UV-Visível (Figura 29a) no qual determinou a presença de uma banda de emissão centrada na região de 795-797 nm. O valor obtido foi inferior ao informado pelo fabricante, entretanto, as SPIONs e Au@SPIONs possuem absorção na região de emissão (Figura 29b). O estudo de novos métodos de tratamento, como a TFT, também conhecida como ablação térmica ou terapia de hipertermia, tem emergido nos últimos anos, principalmente por ser uma terapia não invasiva do câncer que pode reduzir os efeitos colaterais dos pacientes (KUMARI; SHARMA; SAHI, 2021; TIAN *et al.*, 2022; ELAHI, RIZWAN, 2021). A irradiação nessa terapia ocorre na região do NIR (700-1000 nm), com conversão de energia luminosa em térmica do meio, que

é denominado de fotossensibilizador. Quando uma solução coloidal é exposta à irradiação, os elétrons nas nanopartículas são excitados, sendo nesse processo obtido um ganho de energia cinética com geração de calor, que é transferido para o tecido, causando morte das células cancerosas (KUMARI; SHARMA; SAHI, 2021). Sendo assim, este método torna-se promissor, uma vez que as células tumorais apresentam menor tolerância ao calor em relação às células normais, bem como uma maior absorção no tecido devido a região de trabalho (WEI *et al.*, 2019; SAEED; REN; WU, 2018; CHEN *et al.*, 2019; ZHANG *et al.*, 2021; AMATYA *et al.*, 2021; LOZANO-PEDRAZA *et al.*, 2021).

A análise quantitativa por Citometria de fluxo (Figura 30) investigou o tipo de morte após TFT de SPIONs, bem como as Au@SPIONs e mistura de SPIONs com AuNPs sem e com Ce6 na linhagem celular MDA-MB-468. Todas as nanopartículas com TFT têm um efeito citotóxico na linhagem celular MDA MB-468, através dos resultados de morte celular utilizando a coloração de AnnV e PI, em viáveis (AnnV-PI-), apoptóticas (AnnV+ PI-) e necrose (AnnV+ PI+).

Os resultados do número de células viáveis, necrose e apoptose obtido por Citometria de fluxo foram graficados em gráficos de barras para melhor entendimento. A Figura 31a mostrou os resultados dos grupos controle e SPIONs, Figura 31b os resultados dos grupos controle e SPIONs+Ce6 e Figura 31c os resultados dos grupos controle, Au@SPIONs, SPIONs+AuNPs, SPIONs+AuNPs+Ce6 e Ce6. Nos dados de Citometria de fluxo, em todas as concentrações de nanopartículas, apresentaram a apoptose como o tipo de morte celular. Nos controles positivo e negativo, a ação solo do TFT não causou morte significativa para o controle negativo (somente TFT) e a ação do DMSO na presença de TFT causou 100% de morte no controle positivo.

A análise quantitativa por Citometria de fluxo também investigou a viabilidade celular de NTs nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A (Figura 32, Grupo 1 e 2, respectivamente), sendo os resultados obtidos graficados em gráficos de barras para melhor entendimento. A viabilidade celular foi verificada em ambas as linhagens celulares, o que sugere que as NTs não proporcionam efeito citotóxico na ausência de terapia. Entretanto, quando NTs são aplicadas junto com a TFT (Figura 33 – Grupo 3) e TFD (Figura 34 – Grupo 5) proporcionam efeito citotóxico com porcentagens significativas de morte por apoptose na linhagem celular MDA-MB-468.

De acordo com Tian e colaboradores, para indução de apoptose ou necrose nas células tumorais, necessita-se de temperaturas acima de 50°C, entretanto é

observado danos em órgãos e tecidos saudáveis próximos ao tumor devido ao superaquecimento. Como alternativa, nos últimos anos desenvolve-se uma metodologia de TFT com temperaturas inferiores a 45°C (TIAN *et al.*, 2022). Na TFT, o tipo de morte celular é influenciado pela potência do laser e tempo de exposição, pois o uso de uma alta potência tende a desencadear a necrose e uma baixa potência leva à ativação dos mecanismos de apoptose (SAEED; REN; WU, 2018).

De acordo com LOZANO-PEDRAZA e colaboradores, as nanopartículas de óxido de ferro quando aplicadas à TFT, se mostram eficazes, pois causam o estresse térmico nas células tumorais (LOZANO-PEDRAZA *et al.*, 2021). No entanto, a eficiência desta terapia pode ser prejudicada se o aquecimento adequado não for fornecido (KUMARI; SHARMA; SAHI, 2021). Além disso, mesmo após irradiadas não se observa alterações na estabilidade, tamanho ou cristalinidade das nanopartículas (LOZANO-PEDRAZA *et al.*, 2021). De acordo com KHAFAJI e colaboradores, as nanopartículas híbridas Au-Fe₃O₄ protegida com PEG internalizaram em células de adenocarcinoma de mama humano, e após a TFT (λ 808 nm, 0,5 W cm⁻², 7 min) foi observado que 68% das células estavam mortas (KHAFAJI *et al.*, 2016).

De acordo com Cabana e colaboradores (2020) nanopartículas esféricas e nanoflores magnéticas foram aplicadas com TFT e hipertermia magnética. Neste estudo, observou-se que quando as nanopartículas são compostas predominantemente por magnetita, revela resultados promissores para TFT (CABANA *et al.*, 2020). ALIAKBARI e colaboradores (2019), desenvolveram nanopartículas de óxido de ferro superparamagnético de polivinilpirrolidona e relataram que em concentrações entre 10-100 µg/mL, um comportamento citotóxico foi observado na linhagem celular BT-74, mas isso não foi observada na linha celular MRC-5. Portanto, eles inferem que a citotoxicidade das SPIONs está diretamente relacionada ao tipo de célula estudada, bem como ao tipo de revestimento, tempo de exposição e tamanho das nanopartículas (ALIAKBARI *et al.*, 2019).

De acordo com SAEED e colaboradores, a ablação térmica nas membranas celulares causada pela TFT, pode ser obtida em três zonas. Na zona central com predomínio de necrose coagulativa, zona periférica com apoptose e lesão reversível e por tecidos circunvizinhos normais que não são prejudicados pela ablação térmica, porém podem estimular o sistema imunológico. Na TFT, o tipo de morte obtido pode ser necrose ou apoptose, entretanto uma potência alta do laser pode causar necrose, enquanto uma potência baixa obter apoptose (SAEED; REN; WU, 2018).

O mecanismo da via de morte celular é determinado pela extensão do dano com alterações morfológicas específicas. A apoptose é uma forma de morte celular programada caracterizada por alterações morfológicas como retração do citoplasma, condensação da cromatina, fragmentação do núcleo e manutenção da homeostase tecidual. Enquanto nas células necróticas, ocorre um descontrole que geralmente é induzido por inúmeros estresses com fatores físicos ou químicos, com despolarização da membrana interna e ruptura da membrana mitocondrial (FABBRIZI, PARSONS, 2022; JAN et al, 2019). Portanto, desenvolver um método de tratamento onde a via de apoptose seja predominantemente obtida torna-se ideal, pois a morte celular ocorre de forma programada e mais branda, enquanto na necrose há um descontrole com disseminação para o restante do corpo.

Inúmeras nanopartículas funcionalizadas com Ce6 vem sendo estudadas para atuarem como sistemas de entrega para TFD do câncer, uma vez que a Ce6 possui a capacidade de gerar as ERO's quando irradiadas (ALUIGI *et al.*, 2016; CASTILHO *et al.*, 2021; YAN *et al.*, 2022). A produção intracelular de ERO's foi estimada pelo ensaio H₂DCF-DA para a linhagem celular MDA-MB-468, usando concentrações de NTs de 2 µg/mL e 4 µg/mL, conforme mostrado na Figura 35. A TFD junto com as NTs induziu porcentagens significativas de morte na linhagem celular MDA-MB-468, como verificado pela Figura 34. Além disso, é verificado que o nível de ERO's aumenta conforme o aumento na concentração das NTs.

A internalização das NTs na cultura 3D também pode ser confirmada por meio da metodologia Microscopia Confocal (Figura 36). Os resultados iniciais do estudo com a cultura 3D da linha celular MDA-MB-468 foram consistentes com os resultados obtidos com a cultura 2D, sendo possível observar a capacidade de penetração das NTs nos esferoides de câncer de mama para os tempos de 30, 60, 120, 180 e 240 min. de incubação.

6. CONCLUSÃO

As SPIONs foram sintetizadas com sucesso pelo método de coprecipitação química, além de serem estabilizadas com citrato de sódio. Os espectros de absorção em função do pH do meio, concomitante as análises de DLS, permitiram verificar que as nanopartículas quando submetidas a meios ácidos, se desestabilizaram, sedimentaram em virtude da protonação dos radicais carboxílicos, conseqüentemente menor repulsão eletrostáticas entre partículas, que são indicadas pelos valores de potenciais Zeta na região de instabilidade coloidal. Para valores de pH do meio acima de 6, as SPIONs foram estabilizadas ao longo do tempo. As análises de DLS, SEM-FEG, TEM e FT-IR confirmaram que as sínteses de SPIONs apresentaram diâmetros inferiores a 100 nm e foram estabilizadas, uma vez que as bandas vibracionais presentes do citrato de sódio estavam presentes no espectro das SPIONs. Os dados de DRX e VSM mostraram resultados coerentes, pois a principal fase cristalina Fe_3O_4 das SPIONs são superparamagnéticas. O processo de recobrimento com ouro das SPIONs foi eficaz, em virtude da mudança na coloração da solução para cor vermelha, pelo aumento no diâmetro hidrodinâmico e pela presença da banda de absorção centrada em 530 nm. A ausência da formação de nanopartículas de ouro foi confirmada por meio da magnetização da partícula, deixando o sobrenadante transparente. Nas micrografias de TEM em campo claro e escuro foi observada a presença de SPIONs e Au@SPIONs, indicando que no processo de recobrimento ainda existe a presença de SPIONs, entretanto o recobrimento foi confirmado pelo mapeamento feito por EDS, que pontualmente identificou a presença de Au e Fe. A formação do complexo Ce6-cisteamina também foi obtido com a presença da banda ressonante centrada em 402 nm (Banda de Soret) e em 670 nm (Banda Q) referente ao FS. A citotoxicidade das SPIONs foi verificada pelo método de exclusão do azul de tripan e pela atividade mitocondrial nas linhagens MDA-MB-468 e MCF 10A, mostrando resultados promissores com valores de viabilidade acima de 70%. As NTs incorporaram apenas na linhagem celular MDA-MB-468 (que possui superexpressão de EGFR). A internalização das NTs foi analisada por Microscopia Confocal, sendo observado as NTs internalizam no citoplasma e no núcleo de algumas células da linhagem celular MDA-MB-468, entretanto esse comportamento não é observado na linhagem celular MCF 10A. Após o tratamento com TFT, observamos que as nanopartículas nas concentrações estudadas apresentaram percentuais significativos

de apoptose na linhagem celular MDA-MB-468. As NTs na ausência de terapia não proporcionam efeito citotóxico nas linhagens celulares MDA-MB-468 e MCF10A, entretanto, quando NTs são aplicadas junto com a TFT e TFD proporcionam efeito citotóxico com porcentagens significativas de morte por apoptose na linhagem celular MDA-MB-468. Além disso, foi verificado que o nível de ERO's aumenta conforme o aumento na concentração das NTs. A análise de Microscopia Confocal também confirmou a internalização das NTs na cultura 3D, mostrando que houve um potencial de penetração das NTs nos esferoides nos tempos de incubação estudados. Esses resultados iniciais foram consistentes com os resultados obtidos pela metodologia 2D desta tese, sugerindo uma grande oportunidade para pesquisas futuras.

REFERÊNCIAS

ABDULLAH, J. Amin Ahmed *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**, v. 17, p. 100280, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.scp.2020.100280>

ABED, Ziaeddin *et al.* Iron oxide–gold core–shell nano-theranostic for magnetically targeted photothermal therapy under magnetic resonance imaging guidance. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 145, n. 5, p. 1213-1219, 2019. <https://doi.org/10.1007/s00432-019-02870-x>

AGHAZADEH, Mustafa; KARIMZADEH, Isa; GANJALI, Mohammad Reza. Ethylenediaminetetraacetic acid capped superparamagnetic iron oxide (Fe₃O₄) nanoparticles: A novel preparation method and characterization. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 439, p. 312-319, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2017.05.042>

AJINKYA, Nene *et al.* Magnetic Iron Oxide Nanoparticle (IONP) Synthesis to Applications: Present and Future. **Materials**, v. 13, n. 20, p. 4644, 2020. [doi:10.3390/ma13204644](https://doi.org/10.3390/ma13204644)

ALANAZI, Ibrahim O.; KHAN, Zahid. Understanding EGFR signaling in breast cancer and breast cancer stem cells: overexpression and therapeutic implications. **Asian pacific journal of cancer prevention**, v. 17, n. 2, p. 445-453, 2016. DOI:<http://dx.doi.org/10.7314/APJCP.2016.17.2.445>

ALIAKBARI, Maryam *et al.* Differential effect of polyvinylpyrrolidone-coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles on BT-474 human breast cancer cell viability. **Toxicology in Vitro**, v. 54, p. 114-122, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2018.09.018>

AL-MAHMOOD, Sumayah *et al.* Metastatic and triple-negative breast cancer: challenges and treatment options. **Drug delivery and translational research**, v. 8, n. 5, p. 1483-1507, 2018. <https://doi.org/10.1007/s13346-018-0551-3>

ALUIGI, A. *et al.* Chlorin e6 keratin nanoparticles for photodynamic anticancer therapy. **RSC advances**, v. 6, n. 40, p. 33910-33918, 2016. DOI: 10.1039/x0xx00000x

AMATYA, Reeru *et al.* In Vitro and In Vivo Evaluation of PEGylated Starch-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Enhanced Photothermal Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 871, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060871>

AMIRSHAGHAGHI, Ahmad *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. 2613, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39036-1>

ANSARI, Mohammad Javed *et al.* Synthesis and stability of magnetic nanoparticles. **BioNanoScience**, p. 1-12, 2022. <https://doi.org/10.1007/s12668-022-00947-5>

AZHDARZADEH, Morteza *et al.* Theranostic MUC-1 aptamer targeted gold coated superparamagnetic iron oxide nanoparticles for magnetic resonance imaging and photothermal therapy of colon cancer. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 143, p. 224-232, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2016.02.058>

BAJAJ, Bharat; MALHOTRA, B. D.; CHOI, Sunju. Preparation and characterization of bio-functionalized iron oxide nanoparticles for biomedical application. **Thin Solid Films**, v. 519, n. 3, p. 1219-1223, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tsf.2010.08.072>

BEGUM, Akifa *et al.* Cytotoxicity of Iron Nanoparticles Synthesized Using Dried Ginger. **Journal of Pharmaceutical Research International**, p. 112-118, 2020. DOI: 10.9734/jpri/2020/v32i2530829

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. DOI: 10.1016/S1387-2656(05)11004-7

BERTI, Leandro Antunes; PORTO, Luismar Marques. **Nanossegurança: guia de boas práticas em nanotecnologia para fabricação e laboratórios**. Cengage Learning Edições Ltda., 2016.

BOURAMTANE, Soukaina *et al.* Porphyrin-xylan-coated silica nanoparticles for anticancer photodynamic therapy. **Carbohydrate polymers**, v. 213, p. 168-175, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.02.070>

BRENNAN, Grace *et al.* The Effects of a Varied Gold Shell Thickness on Iron Oxide Nanoparticle Cores in Magnetic Manipulation, T1 and T2 MRI Contrasting, and Magnetic Hyperthermia. **Nanomaterials**, v. 10, n. 12, p. 2424, 2020. doi:10.3390/nano10122424

CABANA, Sonia *et al.* Iron oxide mediated photothermal therapy in the second biological window: A comparative study between magnetite/maghemite nanospheres and nanoflowers. **Nanomaterials**, v. 10, n. 8, p. 1548, 2020. <https://doi.org/10.3390/nano10081548>

CANAPARO, Roberto *et al.* Biomedical applications of reactive oxygen species generation by metal nanoparticles. **Materials**, v. 14, n. 1, p. 53, 2020. <https://doi.org/10.3390/ma14010053>

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. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2016.09.011>

CASTILHO, Maiara L. *et al.* Chlorin e6-EGF conjugated gold nanoparticles as a nanomedicine based therapeutic agent for triple negative breast cancer. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, p. 102186, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2021.102186>

CHATTERJEE, Krishnendu *et al.* Core/shell nanoparticles in biomedical applications. **Advances in colloid and interface science**, v. 209, p. 8-39, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2013.12.008>

CHEN, Junqi *et al.* Nanomaterials as photothermal therapeutic agents. **Progress in materials science**, v. 99, p. 1-26, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2018.07.005>

CREȚU, Bianca Elena-Beatrice *et al.* Imaging constructs: the rise of iron oxide nanoparticles. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3437, 2021. <https://doi.org/10.3390/molecules26113437>

DA SILVA ASSIS, Mariane Brandão *et al.* Citrate-capped iron oxide nanoparticles: ultrasound-assisted synthesis, structure and thermal properties. **Materials Research Express**, v. 6, n. 4, p. 045064, 2019. <https://doi.org/10.1088/2053-1591/aaff2a>

DADFAR, Seyed Mohammadali *et al.* Iron oxide nanoparticles: Diagnostic, therapeutic and theranostic applications. **Advanced drug delivery reviews**, v. 138, p. 302-325, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2019.01.005>

DE GÓIS, Meirielle Marques *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. <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2019.01.168>

DE OLIVEIRA, Kleber Thiago *et al.* Conceitos fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do tipo Porfirinas, clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 1, p. 310-335, 2015. 10.5935/1984-6835.20150016

DEMIR, Veysel *et al.* Influence of alpha and gamma-iron oxide nanoparticles on marine microalgae species. **Bulletin of environmental contamination and toxicology**, v. 95, n. 6, p. 752-757, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1633-2>

DHEYAB, M. A. *et al.* Gold-coated iron oxide nanoparticles as a potential photothermal therapy agent to enhance eradication of breast cancer cells. In: **Journal of Physics: Conference Series**. IOP Publishing, 2020. p. 012003. doi:10.1088/1742-6596/1497/1/012003

DOS SANTOS JESUS, Viviane Paula *et al.* Triple-negative breast cancer treatment in xenograft models by bifunctional nanoprobe combined to photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 38, p. 102796, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102796>

DU, Yang *et al.* Core–Shell–Satellite Nanomaterials as Remotely Controlled Self-Fueling Fenton Reagents for Imaging-Guided Triple-Negative Breast Cancer-Specific Therapy. **Small**, v. 16, n. 31, p. 2002537, 2020. DOI: 10.1002/smll.202002537

DULIŃSKA-LITEWKA, Joanna *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles—Current and prospective medical applications. **Materials**, v. 12, n. 4, p. 617, 2019. doi:10.3390/ma12040617

DUSZYŃSKA, Angelika *et al.* Influence of electron-beam irradiation on surface properties of magnetic iron oxide nanoparticles stabilized with citrate. **Radiation Physics and Chemistry**, v. 169, p. 107796, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.radphyschem.2018.03.009>

ELAHI, Narges; RIZWAN, Muhammad. Progress and prospects of magnetic iron oxide nanoparticles in biomedical applications: **A review. Artificial Organs**, v. 45, n. 11, p. 1272-1299, 2021. DOI: 10.1111/aor.14027

ELBIALY, Nihal S. *et al.* Multifunctional magnetic-gold nanoparticles for efficient combined targeted drug delivery and interstitial photothermal therapy. **International journal of pharmaceutics**, v. 554, p. 256-263, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2018.11.021>

ELBIALY, Nihal Saad; FATHY, Mohamed Mahmoud; KHALIL, Wafaa Mohamed. Doxorubicin loaded magnetic gold nanoparticles for in vivo targeted drug delivery. **International journal of pharmaceutics**, v. 490, n. 1-2, p. 190-199, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2015.05.032>

EL-BOUBBOU, Kheireddine. Magnetic iron oxide nanoparticles as drug carriers: preparation, conjugation and delivery. **Nanomedicine**, v. 13, n. 8, p. 929-952, 2018. <https://doi.org/10.2217/nnm-2017-0320>

EYVAZZADEH, Nazila *et al.* Gold-coated magnetic nanoparticle as a nanotheranostic agent for magnetic resonance imaging and photothermal therapy of cancer. **Lasers in medical science**, v. 32, n. 7, p. 1469-1477, 2017. DOI 10.1007/s10103-017-2267-x.

FABBRIZI, Maria Rita; PARSONS, Jason L. Cell death mechanisms in head and neck cancer cells in response to low and high-LET radiation. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 24, 2022. <https://doi.org/10.1017/erm.2021.31>

FARASHAHI, Ali *et al.* Real-time mapping of heat generation and distribution in a laser irradiated agar phantom loaded with gold nanoparticles using MR temperature imaging. **Photodiagnosis and photodynamic therapy**, v. 25, p. 66-73, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2018.11.010>

FERJAOUI, Zied *et al.* Doxorubicin-Loaded Thermoresponsive Superparamagnetic Nanocarriers for Controlled Drug Delivery and Magnetic Hyperthermia Applications. **ACS applied materials & interfaces**, v. 11, n. 34, p. 30610-30620, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsami.9b10444>

FULLER, Eric G. *et al.* Externally triggered heat and drug release from magnetically controlled nanocarriers. **ACS Applied Polymer Materials**, v. 1, n. 2, p. 211-220, 2019. <https://doi.org/10.1021/acsapm.8b00100>

GHAZNAVI, Habib *et al.* Folic acid conjugated PEG coated gold-iron oxide core-shell nanocomplex as a potential agent for targeted photothermal therapy of cancer. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 8, p. 1594-1604, 2017. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1384384>

GHAZNAVI, Habib *et al.* Folic acid conjugated PEG coated gold–iron oxide core–shell nanocomplex as a potential agent for targeted photothermal therapy of cancer. **Artificial cells, nanomedicine, and biotechnology**, v. 46, n. 8, p. 1594-1604, 2018. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1384384>

GHORBANI, Marjan *et al.* Preparation of thermo and pH-responsive polymer@ Au/Fe₃O₄ core/shell nanoparticles as a carrier for delivery of anticancer agent. **Journal of nanoparticle research**, v. 17, n. 7, p. 1-13, 2015. DOI 10.1007/s11051-015-3097-z

HADI, Fahimeh *et al.* Combinatorial effects of radiofrequency hyperthermia and radiotherapy in the presence of magneto-plasmonic nanoparticles on MCF-7 breast cancer cells. **Journal of cellular physiology**, 2019. DOI: 10.1002/jcp.28599

HEDAYATNASAB, Ziba *et al.* Synthesis and in-vitro characterization of superparamagnetic iron oxide nanoparticles using a sole precursor for hyperthermia therapy. **Materials Research Bulletin**, v. 132, p. 110975, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2020.110975>

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, Aldahir A. *et al.* Iron oxide nanoparticles: synthesis, functionalization, and applications in diagnosis and treatment of cancer. **Chemical Papers**, v. 74, n. 11, p. 3809-3824, 2020. <https://doi.org/10.1007/s11696-020-01229-8>

HOU, Zhenyu *et al.* Size-changeable nanoprobe for the combined radiotherapy and photodynamic therapy of tumor. **European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging**, p. 1-13, 2022. <https://doi.org/10.1007/s00259-022-05830-9>

HSU, Jennifer L.; HUNG, Mien-Chie. The role of HER2, EGFR, and other receptor tyrosine kinases in breast cancer. **Cancer and Metastasis Reviews**, v. 35, n. 4, p. 575-588, 2016. doi:10.1007/s10555-016-9649-6.

HUANG, Yuxiong; KELLER, Arturo A. EDTA functionalized magnetic nanoparticle sorbents for cadmium and lead contaminated water treatment. **Water research**, v. 80, p. 159-168, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2015.05.011>

HUSSAIN, Zubaida Fida *et al.* Prognostic significance of epidermal growth factor receptor (EGFR) over expression in urothelial carcinoma of urinary bladder. **BMC urology**, v. 18, n. 1, p. 59, 2018. <https://doi.org/10.1186/s12894-018-0373-0>

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA), 2019.

ISRAEL, Liron L. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles for imaging, targeting and treatment of primary and metastatic tumors of the brain. **Journal of Controlled Release**, v. 320, p. 45-62, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.01.009>

JAN, Rehmat *et al.* Understanding apoptosis and apoptotic pathways targeted cancer therapeutics. **Advanced pharmaceutical bulletin**, v. 9, n. 2, p. 205, 2019. [10.15171/apb.2019.024](https://doi.org/10.15171/apb.2019.024)

JIAO, Wangbo *et al.* Design of magnetic nanoplatforms for cancer theranostics. **Biosensors**, v. 12, n. 1, p. 38, 2022. <https://doi.org/10.3390/bios12010038>

JURADO PALOMARES, Rocío *al.* Nanoestructuras híbridas bioinorgánicas. **Aplicaciones en nanomedicina**. 2019.

KADKHODA, Jamileh *et al.* Advances in antibody nanoconjugates for diagnosis and therapy: A review of recent studies and trends. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 185, p. 664-678, 2021. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.06.191>

KAMMARI, R.; DAS, N. G.; DAS, S. K. Nanoparticulate systems for therapeutic and diagnostic applications. In: (Ed.). **Emerging Nanotechnologies for Diagnostics, Drug Delivery and Medical Devices: Elsevier**, 2017. p.105-144. <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-323-42978-8.00006-1>

KHAFAJI, Mona *et al.* A new bifunctional hybrid nanostructure as an active platform for photothermal therapy and MR imaging. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, p. 1-12, 2016. <https://doi.org/10.1038/srep27847>

KIRUBHA, SP Angeline; RAJPUT, Alankruti. Enhancement of thermal imaging by iron oxide nanoparticle—Preliminary study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 17, p. 352-360, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2018.12.005>

KJAER, Ina Mathilde *et al.* Prognostic and predictive value of EGFR and EGFR-ligands in blood of breast cancer patients: a systematic review. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)**, v. 56, n. 5, p. 688-701, 2018. <https://doi.org/10.1515/cclm-2017-0592>

KRUKOWSKI, Sylwester; KARASIEWICZ, Mateusz; KOLODZIEJSKI, Waclaw. Convenient UVspectrophotometric determination of citrates in aqueous solutions with applications in the pharmaceutical analysis of oral electrolyte formulations. **Journal of food and drug analysis**, v. 25, n. 3, p. 717-722, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2017.01.009>

KUMARI, Sangeeta; SHARMA, Nilesh; SAHI, Shivendra V. Advances in cancer therapeutics: Conventional thermal therapy to nanotechnology-based photothermal therapy. **Pharmaceutics**, v. 13, n. 8, p. 1174, 2021. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081174>

LAGROW, Alec P. *et al.* Unravelling the growth mechanism of the co-precipitation of iron oxide nanoparticles with the aid of synchrotron X-Ray diffraction in solution. **Nanoscale**, v. 11, n. 14, p. 6620-6628, 2019. DOI: 10.1039/c9nr00531e

LE, Uyen Minh; HARTMAN, Amanda; PILLAI, Gopalakrishna. Enhanced selective cellular uptake and cytotoxicity of epidermal growth factor-conjugated liposomes containing curcumin on EGFR-overexpressed pancreatic cancer cells. **Journal of drug targeting**, v. 26, n. 8, p. 676-683, 2018. <https://doi.org/10.1080/1061186X.2017.1408114>

LEV, Sima. Targeted therapy and drug resistance in triple-negative breast cancer: the EGFR axis. **Biochemical Society Transactions**, v. 48, n. 2, p. 657-665, 2020. <https://doi.org/10.1042/BST20191055>

LI, Kai; NEJADNIK, Hossein; DALDRUP-LINK, Heike E. Next-generation superparamagnetic iron oxide nanoparticles for cancer theranostics. **Drug discovery today**, v. 22, n. 9, p. 1421-1429, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.04.008>

LI, Lan-Ya *et al.* DNA repair pathways in cancer therapy and resistance. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 2520, 2021. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.629266>

LI, Wei *et al.* Overexpression of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and HER-2 in bladder carcinoma and its association with patients' clinical features. **Medical science monitor: international medical journal of experimental and clinical research**, v. 24, p. 7178, 2018. 10.12659/MSM.911640

LOZANO-PEDRAZA, Claudia *et al.* Assessing the parameters modulating optical losses of iron oxide nanoparticles under near infrared irradiation. **Nanoscale Advances**, v. 3, n. 22, p. 6490-6502, 2021. DOI: 10.1039/d1na00601k

LUCAS, Leanne J. *et al.* Development of a sensitive, stable and EGFR specific molecular imaging agent for surface enhanced Raman spectroscopy. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 46, n. 5, p. 434-446, 2015. <https://doi.org/10.1002/jrs.4678>

MASSART, Rene. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE transactions on magnetics**, v. 17, n. 2, p. 1247-1248, 1981. 0018-9464/SI/0300-1247\$00.75 0 1981 IEEE

MEKSERIWATTANA, Wid *et al.* The impact of serum proteins and surface chemistry on magnetic nanoparticle colloidal stability and cellular uptake in breast cancer cells. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 2, p. 1-9, 2019. <https://doi.org/10.1208/s12249-018-1275-x>

MÉRIDA, Fernando *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, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2015.06.076>

MIN, Hyun-Ki *et al.* Folate receptor-targeted liposomal nanocomplex for effective synergistic photothermal-chemotherapy of breast cancer in vivo. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 173, p. 539-548, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.10.013>

MIRRAHIMI, Mehri *et al.* A thermo-responsive alginate nanogel platform co-loaded with gold nanoparticles and cisplatin for combined cancer chemo-photothermal therapy. **Pharmacological research**, v. 143, p. 178-185, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2019.01.005>

MOHAPATRA, Jeotikanta; LIU, Jia Ping. Rare-Earth-free permanent magnets: the past and future. **Handbook of magnetic materials**, v. 27, p. 1-57, 2018. <https://doi.org/10.1016/bs.hmm.2018.08.001>

MOKHOSI, Seipati Rosemary *et al.* Advances in the Synthesis and Application of Magnetic Ferrite Nanoparticles for Cancer Therapy. **Pharmaceutics**, v. 14, n. 5, p. 937, 2022. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14050937>

MOLKENOVA, Anara *et al.* Designing inorganic nanoparticles into computed tomography and magnetic resonance (CT/MR) imaging-guidable photomedicines. **Materials Today Nano**, p. 100187, 2022.

MUEHLBERGER, Marina *et al.* Functionalization Of T Lymphocytes With Citrate-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles For Magnetically Controlled Immune Therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 14, p. 8421-8432, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.10.022>

NANDI, Ramesh *et al.* A novel nanohybrid for cancer theranostics: folate sensitized Fe₂O₃ nanoparticles for colorectal cancer diagnosis and photodynamic therapy. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 5, n. 21, p. 3927-3939, 2017. DOI: 10.1039/C6TB03292C

NEPOMUCENO, Leandro Lopes *et al.* **Padronização metodológica in vitro do ensaio colorimétrico MTT para avaliação da atividade de formazan e dosagem do fármaco: padronização do teste colorimétrico MTT.** 2021. 10.37885/201202541

NI, Dalong *et al.* Magnetic Targeting of Nanotheranostics Enhances Cerenkov Radiation-Induced Photodynamic Therapy. **Journal of the American Chemical Society**, v. 140, n. 44, p. 14971-14979, 2018. DOI: 10.1021/jacs.8b09374

NOSRATI, Hamed *et al.* Bovine serum albumin stabilized iron oxide and gold bimetallic heterodimers: Synthesis, characterization and Stereological study. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 33, n. 10, p. e5155, 2019. <https://doi.org/10.1002/aoc.5155>

OEHRlich, Nadja E. *et al.* Clinical outcome of brain metastases differs significantly among breast cancer subtypes. **Oncology letters**, v. 14, n. 1, p. 194-200, 2017. DOI: 10.3892/ol.2017.6166

ONO, Bruno Andrade. **Avaliação da resposta fotodinâmica em células de melanoma murino utilizando Photodithazine.** 2016. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PANDA, Jnanranjan *et al.* Engineered polymeric iron oxide nanoparticles as potential drug carrier for targeted delivery of docetaxel to breast cancer cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 485, p. 165-173, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2019.04.058>

PANDEY, Namita *et al.* Transition metal oxide nanoparticles are effective in inhibiting lung cancer cell survival in the hypoxic tumor microenvironment. **Chemico-biological interactions**, v. 254, p. 221-230, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.006>

PENG, Qiuxia *et al.* Recent Advances in Transition-Metal Based Nanomaterials for Noninvasive Oncology Thermal Ablation and Imaging Diagnosis. **Frontiers in Chemistry**, v. 10, 2022. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.899321>

PEREIRA, Tatiana Aparecida Verissimo. **Nanopartículas de óxidos de ferro e nióbio com diferentes recobrimentos: síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico**. 2018. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.

PON-ON, Weeraphat *et al.* Investigation of magnetic silica with thermoresponsive chitosan coating for drug controlled release and magnetic hyperthermia application. **Materials Science and Engineering: C**, v. 97, p. 23-30, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.11.076>

PROKOPIOU, Danai *et al.* Synthesis and characterization of modified magnetic nanoparticles as theranostic agents: in vitro safety assessment in healthy cells. **Toxicology in Vitro**, v. 72, p. 105094, 2021.

RADOŃ, Adrian *et al.* Structure and optical properties of Fe₃O₄ nanoparticles synthesized by coprecipitation method with different organic modifiers. **Materials Characterization**, v. 131, p. 148- 156, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.matchar.2017.06.034>

RAHMAN, Masoud *et al.* Biomedical applications of superparamagnetic nanoparticles in molecular scale. **Current Organic Chemistry**, v. 19, n. 11, p. 982-990, 2015.

RAJENDRAN, Sorna Prema; SENGODAN, Kandasamy. Synthesis and characterization of zinc oxide and iron oxide nanoparticles using *Sesbania grandiflora* leaf extract as reducing agent. **Journal of Nanoscience**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8348507>

ROSÁRIO, Mila de Oliveira Hughes Veiga *et al.* **Avaliação da citotoxicidade do veneno de bothrops leucurus e toxinas isoladas em linhagens celulares de gliomas**. 2018. Tese de Doutorado. Instituto Gonçalo Moniz.

ROST, N. C. V. *et al.* Magnetic particle imaging performance of liposomes encapsulating iron oxide nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 504, p. 166675, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2020.166675>

S STEELMAN, Linda *et al.* Critical roles of EGFR family members in breast cancer and breast cancer stem cells: targets for therapy. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 16, p. 2358-2388, 2016.

SAEED, Madiha; REN, Wenzhi; WU, Aiguo. Therapeutic applications of iron oxide based nanoparticles in cancer: basic concepts and recent advances. **Biomaterials science**, v. 6, n. 4, p. 708-725, 2018. DOI:10.1039/C7BM00999B

SANAD, Mohamed F. *et al.* Superparamagnetic Fe/Au Nanoparticles and Their Feasibility for Magnetic Hyperthermia. **Applied Sciences**, v. 11, n. 14, p. 6637, 2021. <https://doi.org/10.3390/app11146637>

SCHWAMINGER, Sebastian P.; BAUER, David; FRAGA-GARCÍA, Paula. Gold-iron oxide nanohybrids: insights into colloidal stability and surface-enhanced Raman detection. **Nanoscale Advances**, v. 3, n. 22, p. 6438-6445, 2021. DOI: 10.1039/d1na00455g

SEKAR, Gajalakshmi *et al.* Exploring the interaction between iron oxide nanoparticles (IONPs) and human serum albumin (HSA): spectroscopic and docking studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 241, p. 793-800, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2017.06.093>

SHABATINA, Tatyana I. *et al.* Magnetic Nanoparticles for Biomedical Purposes: Modern Trends and Prospects. **Magnetochemistry**, v. 6, n. 3, p. 30, 2020. <https://doi.org/10.3390/magnetochemistry6030030>

SIRKISOON, Sherona R. *et al.* EGFR and HER2 signaling in breast cancer brain metastasis. **Frontiers in bioscience (Elite edition)**, v. 8, p. 245, 2016. doi: 10.2741/e765

SKLUTE, Elizabeth 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. <https://doi.org/10.1007/s00269-017-0897-y>

SOARES, Guilherme Augusto. **Biosusceptometria AC multicanal para avaliação in vivo de perfis farmacocinéticos de nanopartículas magnéticas por imagens.** 2018.

SOOD, Ankur *et al.* Ascorbic acid-mediated synthesis and characterisation of iron oxide/gold core-shell nanoparticles. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 11, n. 5, p. 370-382, 2015. <https://doi.org/10.1080/17458080.2015.1066514>

STANDARD, I. **Biological evaluation of medical devices—Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity.** Geneve, Switzerland: International Organization for Standardization, 2009.

STEIN, René *et al.* Synthesis and Characterization of Citrate-Stabilized Gold-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles for Biomedical Applications. **Molecules**, v. 25, n. 19, p. 4425, 2020. 10.3390/molecules25194425

STOCKERT, Juan C. *et al.* MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta histochemica**, v. 114, n. 8, p. 785-796, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2012.01.006>

STRICKLER, Alaina L.; ESCUDERO-ESCRIBANO, María; JARAMILLO, Thomas F. Core-shell Au@ metal-oxide nanoparticle electrocatalysts for enhanced oxygen evolution. **Nano Letters**, v. 17, n. 10, p. 6040-6046, 2017. <https://doi.org/10.1021/acs.nanolett.7b02357>

SUN, Y. S. *et al.* Risk factors and preventions of breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 11, p. 1387–1397, 2017. Doi: 10.7150/ijbs.21635

TIAN, Boshi *et al.* Near Infrared-Triggered Theranostic Nanoplatform with Controlled Release of HSP90 Inhibitor for Synergistic Mild Photothermal and Enhanced Nanocatalytic Therapy with Hypoxia Relief. **Small**, p. 2200786, 2022. DOI: 10.1002/sml.202200786

UNNI, Mythreyi *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, 2017. <https://doi.org/10.1021/acsnano.7b00609>

VIEIRA, Paula *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. <https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102997>

VIEIRA, René Aloisio da Costa; FORMENTON, Alessandro; BERTOLINI, Silvia Regina. Breast cancer screening in Brazil. Barriers related to the health system. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 63, n. 5, p. 466-474, 2017. <http://dx.doi.org/10.1590/1806-9282.63.05.466>

VIKRAM, S. *et al.* Investigations of suspension stability of iron oxide nanoparticles using time-resolved UV–visible spectroscopy. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 18, n. 9, p. 1-24, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11051-016-3570-3>

WAN, Guoyun *et al.* Nanoscaled red blood cells facilitate breast cancer treatment by combining photothermal/photodynamic therapy and chemotherapy. **Biomaterials**, v. 155, p. 25-40, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2017.11.002>

WANG, Hui *et al.* Iron oxide-carbon core-shell nanoparticles for dual-modal imaging-guided photothermal therapy. **Journal of Controlled Release**, v. 289, p. 70-78, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2018.09.022>

WEI, Wenfeng *et al.* Biomedical and bioactive engineered nanomaterials for targeted tumor photothermal therapy: a review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 104, p. 109891, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109891>

WILLIAM D. B., CARTER, B. C., Transmission Electron Microscopy, **A textbook for Materials Science**. Springer, New York, NY, 2009.

WU, Kai *et al.* Investigation of Commercial Iron Oxide Nanoparticles: Structural and Magnetic Property Characterization. **ACS omega**, v. 6, n. 9, p. 6274-6283, 2021. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c05845>

XU, Weijun *et al.* A dual-targeted hyaluronic acid-gold nanorod platform with triple-stimuli responsiveness for photodynamic/photothermal therapy of breast cancer. **Acta biomaterialia**, v. 83, p. 400-413, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.026>

YAN, Kai *et al.* Pt nanoenzyme decorated yolk-shell nanoplatform as an oxygen generator for enhanced multi-modality imaging-guided phototherapy. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 616, p. 759-768, 2022. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2022.02.042>

YANG, Rui-Meng *et al.* Hyaluronan-modified superparamagnetic iron oxide nanoparticles for bimodal breast cancer imaging and photothermal therapy. **International journal of nanomedicine**, v. 12, p. 197, 2017. 10.2147/IJN.S121249

YANG, Tsung-Ming *et al.* Bcl-2 family proteins contribute to apoptotic resistance in lung cancer multicellular spheroids. **American journal of respiratory cell and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 14-23, 2009. DOI: 10.1165/rcmb.2008-0320OC.

YOUHANNAYEE, Maryam *et al.* Physical characterization and uptake of iron oxide nanoparticles of different prostate cancer cells. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 473, p. 205-214, 2019.
<https://doi.org/10.1016/j.jmmm.2018.10.062>

ZHANG, Dong *et al.* Dual modal imaging-guided drug delivery system for combined chemo-photothermal melanoma therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 16, p. 3457, 2021. doi: 10.2147/IJN.S306269

ZHANG, J.; MISRA, R. D. K. Nanomaterials in microfluidics for disease diagnosis and therapy development. **Materials Technology**, v. 34, n. 2, p. 92-116, 2018. DOI: 10.1080/10667857.2018.1527803

ZHANG, Ying *et al.* Affibody-functionalized Ag₂S quantum dots for photoacoustic imaging of epidermal growth factor receptor overexpressed tumors. **Nanoscale**, v. 10, n. 35, p. 16581-16590, 2018. DOI: 10.1039/C8NR02556H

ZHU, Nan *et al.* Surface modification of magnetic iron oxide nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 8, n. 10, p. 810, 2018. <https://doi.org/10.3390/nano8100810>

APÊNDICE A – ARTIGO “SYNTHESIS OF IRON OXIDE NANOPARTICLES STABILIZED WITH SODIUM CITRATE AND TMAOH” PUBLICADO NO PERÍODO.

Research, Society and Development, v. 11, n. 16, e139111637698, 2022
(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v11i16.37698>

Synthesis of iron oxide nanoparticles stabilized with sodium citrate and TMAOH

Síntese de nanopartículas de óxido de ferro estabilizadas com citrato de sódio e TMAOH

Síntesis de nanopartículas de óxido de hierro estabilizadas con citrato de sódio y TMAOH

Received: 11/09/2022 | Revised: 11/22/2022 | Accepted: 11/24/2022 | Published: 12/02/2022

Marcela Aparecida Cândido

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2034-6688>

Nanosensors Laboratory, Research & Development Institute, Brazil

Vale do Paraíba University, Brazil

E-mail: marcela.aparecida.candido@gmail.com

Nathanne Cristina Vilela Rost

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4616-492X>

Université Sorbonne Paris Nord, France

Université de Paris, France

E-mail: nathannerost@gmail.com

Virginia Rezende Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5118-6955>

Nanosensors Laboratory, Research & Development Institute, Brazil

Vale do Paraíba University, Brazil

E-mail: virginia.rezende@gmail.com

Leandro Raniero

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1962-8346>

Nanosensors Laboratory, Research & Development Institute, Brazil

Vale do Paraíba University, Brazil

E-mail: lrniero@univap.br

Abstract

Iron oxide nanoparticles (IONPs) represents a class of magnetic and biocompatible nanomaterials that have been widely used in research and medical applications, such as hyperthermia studies, as contrast agents for magnetic resonance imaging, biosensors, among others. However, their application depends on factors as surface properties, size, and morphology being appropriately balanced. IONPs can be obtained by different synthesis methods, however, chemical coprecipitation represents a simpler, easier and faster route, in which aqueous solutions of precursors containing iron (Fe^{3+}) and ferrous (Fe^{2+}) ions are alkalized under control of temperature and pH. This study proposes to synthesize iron oxide nanoparticles by the chemical coprecipitation method and to stabilize them with sodium citrate (IONPs-CIT) and tetramethylammonium hydroxide (IONPs-TMAOH). Furthermore, to characterize the hydrodynamic diameter and the Zeta Potential of the samples by Dynamic Light Scattering. The cytotoxicity of IONPs- CIT in the MDA-MB-468 cell line was evaluated through the analysis of mitochondrial activity.

Keywords: Iron oxide nanoparticles; Chemical coprecipitation; Dynamic light scattering; Cytotoxicity.

Resumo

As nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) representam uma classe de nanomateriais magnéticos e biocompatíveis que têm sido amplamente utilizados em pesquisas e aplicações médicas, como estudos de hipertermia, como agentes de contraste para ressonância magnética, biosensores, entre outros. Entretanto, sua aplicação depende de fatores como, morfologia, tamanho e propriedade de superfície estejam ajustados. As IONPs podem ser obtidas por diferentes métodos de síntese, no entanto, a coprecipitação química representa uma rota de síntese mais simples, fácil e rápida, na qual soluções aquosas de precursores contendo ions ferro (Fe^{3+}) e ferroso (Fe^{2+}) são alcalinizadas sob controle de temperatura e pH. Este estudo propõe sintetizar nanopartículas de óxido de ferro pelo método de coprecipitação química e estabilizá-las com citrato de sódio (IONPs-CIT) e hidróxido de tetrametilamônio (IONPs-TMAOH). Além disso, caracterizar o diâmetro hidrodinâmico e o Potencial Zeta das amostras por espalhamento dinâmico da luz. A citotoxicidade das IONPs-CIT na linhagem celular MDA-MB-468 foi avaliada através da análise da atividade mitocondrial.

Palavras-chave: Nanopartículas de óxido de ferro; Coprecipitação química; Espalhamento dinâmico da luz; Citotoxicidade.

Resumen

Las nanopartículas de óxido de hierro (IONPs) representan una clase de nanomateriales magnéticos y biocompatibles que han sido ampliamente utilizados en investigación y aplicaciones médicas, tales como estudios de hipertermia, agentes de contraste para resonancia magnética, biosensores, entre otros. Sin embargo, su aplicación depende de un balance apropiado en factores como la morfología, el tamaño y las propiedades superficiales. Los IONP se pueden

APÊNDICE B – ARTIGO “GOLD-COATED SUPERPARAMAGNETIC IRON OXIDE NANOPARTICLES FUNCTIONALIZED TO EGF AND CE6 COMPLEXES FOR BREAST CANCER DIAGNOSES AND THERAPY” PUBLICADO NO PERÍODO.



pharmaceutics



Article

Gold-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized to EGF and Ce6 Complexes for Breast Cancer Diagnoses and Therapy

Marcela Cândido ¹, Paula Vieira ¹, Andrea Campos ², Cristina Soares ³ and Leandro Raniero ^{1,*}

¹ Nanosensors Laboratory, Research & Development Institute, University of Paraíba Valley, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos 12244-000, São Paulo, Brazil

² Aix-Marseille University, FSCM (FR1739), CP2M, 13397 Marseille, France

³ Cellular Compartment Dynamics Laboratory, Research & Development Institute, University of Paraíba Valley, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos 12244-000, São Paulo, Brazil

* Correspondence: lraniero@univap.br; Tel.: +55-12-3947-1132

Abstract: Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) have some limitations in the physiological environment, however, a modification on their surface, such as a core-shell structure with gold (SPIONs@Au), can enhance their applicability. In this study, SPIONs were synthesized by the chemical coprecipitation method, stabilized by sodium citrate, and followed by the gold-coating process. SPIONs@Au were functionalized with EGF- α -lipoic acid and chlorin e6 (Ce6)-cysteamine complexes, composing a Theranostic Nanoprobe (TP). The outcomes showed that the SPIONs@Au had changed in color to red and had an absorption band centered at 530 nm. The coating was verified in the TEM micrographs in bright and dark fields by EDS mapping, which indicated the presence of Au and Fe. The Ce6-cysteamine complex had a resonant band at 670 nm that enabled the diagnosis of biological samples using fluorescence analysis. In the measure of TNBC cell uptake, the maximum value of TP fluorescence intensity was obtained within 4 h of internalization. At 2 h, the incorporation of the TP in the cytoplasm as well as in the nuclei was observed, suggesting that it could be employed as a diagnostic marker. The PTT results showed significant percentages of apoptosis in the TNBC cell line, which confirms the efficacy of the TP.

Keywords: magnetic nanoparticles; core-shell nanoparticle; theranostic nanoprobe; photothermal therapy



Citation: Cândido, M.; Vieira, P.; Campos, A.; Soares, C.; Raniero, L. Gold-Coated Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles Functionalized to EGF and Ce6 Complexes for Breast Cancer Diagnoses and Therapy. *Pharmaceutics* **2023**, *15*, 100. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15010100>

Academic Editors: Damiano Cirri and Federica De Castro

Received: 25 November 2022

Revised: 20 December 2022

Accepted: 23 December 2022

Published: 28 December 2022



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The conventional systems for drug delivery have improved due to the application of nanotechnology in the healthcare area. The morphology and size of nanoparticles are important parameters for their production and application, since an increased surface area increases reactivity and the release of ions, whilst the effectiveness of these particles depends on their composition and solubility [1]. Thus, the physical and chemical properties of nanoparticles are directly influenced by their shape, size, crystal structure, chemical composition, and dispersibility [2,3], which all affect the performance of the function of these materials in their applications [4]. Among the materials, iron oxide nanoparticles (IONPs) have unique magnetic properties such as having high magnetic susceptibility, being superparamagnetic, and having low Curie temperature [2,3].

The IONPs are inorganic particles that are composed mostly of magnetite (Fe_3O_4), maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), or hematite ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$). These nanoparticles have been used in biomedical applications for drug separation, drug delivery, hyperthermia, biosensors, and Photothermal Therapy (PTT). Due to their ability to increase the reactivity of drugs in combination therapies or as hyperthermia agents, their therapeutic applicability has emerged primarily for the treatment of cancer [1,5–7]. These nanoparticles in combination

APÊNDICE C – ARTIGO “SPECIFIC NANOMARKERS FLUORESCENCE: *IN VITRO* ANALYSIS FOR EGFR OVEREXPRESSED CELLS IN TRIPLE-NEGATIVE BREAST CANCER AND MALIGNANT GLIOBLASTOMA” PUBLICADO NO PERÍODO.

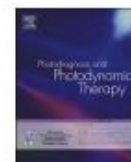
Photodiagnosis and Photodynamic Therapy 39 (2022) 102997



Contents lists available at ScienceDirect

Photodiagnosis and Photodynamic Therapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/pdpdt



Specific nanomarkers fluorescence: *in vitro* analysis for EGFR overexpressed cells in triple-negative breast cancer and malignant glioblastoma

Paula Vieira^a, Viviane Jesus^a, Marcela Aparecida Cândido^a, Cristina Pacheco-Soares^b,
Maiara Castilho^c, Leandro Raniero^{a,*}

^a Nanosensors Laboratory, Research & Development Institute, Vale do Paraíba University, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil

^b Dynamics of Cellular Compartments Laboratory, Research & Development Institute, Vale do Paraíba University, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil

^c Bionanotechnology Laboratory, Research & Development Institute, Vale do Paraíba University, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
EGFR
Nanomedicine
EGF
Ce6
Fluorescence

ABSTRACT

Background: Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR receptor) is encoded by the *EGFR* gene. EGFR receptor signaling pathways are activated by EGF protein, regulating cell actions. Overexpression of EGFR receptor may be linked to malignancies with a poor prognosis. As a result, EGFR receptor is being studied for a variety of tumor diagnostics, spurring the development of innovative approaches to increase quality and efficiency. Nanomaterials can recognize cancer cells by specifically targeting of molecular pathways, underscoring the importance of nanomedicine. In this study, we synthesized EGFR-specific nanomarkers by functionalizing EGF protein and Chlorin e6 in gold nanoparticles. These nanoparticles use active targeting to deliver EGF protein to EGFR receptor, and Chlorin e6 serves as a fluorescent marker molecule

Methods: Nanomarkers were examined *in vitro* in MDA-MB-468 and M059J cell lines. Confocal microscopy and flow cytometry were used to examine the distribution, uptake, internalization, and fluorescence intensity of nanomarkers *in vitro*

Results: The results show that both lines examined accumulate nanomarkers. However, MDA-MB-468 had the highest intensity due to its EGFR receptor overexpression properties

Conclusion: The findings point to ideal properties for detecting EGFR receptor overexpressed cells.

1. Introduction

The Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR receptor) is a glycoprotein that belongs to the receptor tyrosine kinase subclass [1,2]. The *EGFR* gene from the ErbB gene family (ErbB1/EGFR/HER1) encodes EGFR receptor in a genomic context. Furthermore, the *EGFR* gene is expressed in various organs, including the placenta, lung, skin, and thyroid [3–5].

EGFR receptor is placed on the cell membrane's surface and has three structural regions: N-terminal, transmembrane, and C-terminal [6]. The N-terminal domain serves as an extracellular binding domain. This region is specialized for ligands such as EGF, TGF- α , amphiregulin, and betacellulin. The lipophilic transmembrane domain permeates the cell membrane, increasing intracellular and extracellular communication. The C-terminal domain is an intracellular hydrophobic region that is involved in tyrosine kinase activity [1–3,6].

EGFR receptor is activated by extracellular specific ligands such as EGF protein. Extracellular domain activation occurs through ligand-receptor binding and dimerization [1,2,4]. Dimerization generates intracellular signals that are transduced by molecular processes, activating a signaling cascade and transcribing genes [1,2,4]. The pathway activation enhances cell functions such as proliferation, adhesion, differentiation, and invasion [7,8].

This pathway's atypical condition or disorder may cause abnormal *EGFR* gene activation. Since *EGFR* gene exons 18 to 21 encode receptor tyrosine kinase activity, abnormal activation may result in EGFR receptor overexpression. EGFR receptor overexpression leads to mitogenic signaling and a variety of cellular actions that promote tumor formation. Increased cell proliferation potential, resistance to apoptosis and angiogenesis, junction complexes breakdown impairing cell adhesion, contributes to motility and invasive phenotype [3,9,10].

As a result, *EGFR* gene mutations cause the most aggressive

* Corresponding author at: Nanosensors Laboratory - Research & Development Institute of Vale do Paraíba University. 2911 Shishima Hifumi Avenue, 12244-000 São José dos Campos, São Paulo, Brazil.

E-mail addresses: cpsoares@univap.br (C. Pacheco-Soares), mcastilho@univap.br (M. Castilho), lrnaniero@univap.br (L. Raniero).

<https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2022.102997>

Received 24 January 2022; Received in revised form 28 June 2022; Accepted 29 June 2022

Available online 1 July 2022

1572-1000/© 2022 Elsevier B.V. All rights reserved.

APÊNDICE D – ARTIGO “THE COMPARISON BETWEEN LABEL-FREE AND NON-CROSS-LINKING METHODS WITH GOLD NANOPARTICLES FOR COLORIMETRIC DETECTION OF *PARACOCIDIODES BRASILIENSIS*” PUBLICADO NO PERÍODO.

Research on Biomedical Engineering (2019) 35:39–44
<https://doi.org/10.1007/s42600-019-00007-0>

ORIGINAL ARTICLE



The comparison between label-free and non-cross-linking methods with gold nanoparticles for colorimetric detection of *Paracoccidioides brasiliensis*

M. A. Cândido¹ · O. O. Comparato-Filho¹ · I. R. Oliveira² · M. L. Castilho³ · L. Raniero¹

Received: 8 August 2018 / Accepted: 4 February 2019 / Published online: 9 April 2019
 © Sociedade Brasileira de Engenharia Biomedica 2019

Abstract

Introduction Paracoccidioidomycosis is a systemic fungal disease caused by thermos-dimorphic fungus *Paracoccidioides brasiliensis* (*P. brasiliensis*). Gold nanoparticles (AuNPs) are used in diagnosis because of its versatility and biocompatibility, optical properties influenced by surface plasmon resonance, and the size and geometry.

Methods The colorimetric detection of the fungus *P. brasiliensis* was performed by AuNPs and specific 5.8S ribosomal complementary DNA sequence probe. The label-free methodologies had a final concentration of 2.22 nM, 155.95 nM, and 433.33 μM for AuNPs, primers, and MgCl₂·6H₂O solution, respectively. For the non-cross-linking method, the final concentration of the thiolate oligonucleotides and MgCl₂·6H₂O solution were 291.54 mM and 0.39 mM, respectively.

Results The Gaussian curve analyses provided Gaussian center, full width at half maximum value, and Gaussian area, which are complementary colorimetric results. The test accuracy calculated using ROC curve analyses for the label-free and non-cross-linking methods were found to be 0.994 and 0.976, respectively. The sensitivity and specificity were 92% and 98.1%, respectively for label free, and 92% and 80%, respectively, for non-cross-linking test.

Conclusion The alternative methodologies can be used in colorimetric detection of fungus *P. brasiliensis*, which the rRNA sequence could be differentiated by alteration in their staining and confirmed by the Gaussian curve and ROC curve analyses.

Keywords *Paracoccidioides brasiliensis* · rRNA · Gold nanoparticle · Label free · Box plots · ROC curve

Introduction

Nanotechnology has attracted major interest in various areas of research, with interdisciplinary applications in biology,

chemistry, and physics (Wang and Ma 2009). Metal nanoparticles are used in diagnosis because of their unique properties of size and geometry, high reactivity in the living cells, stability over high temperatures, translocation into the cells, exceptional optical properties, and highly tunable spectral behavior (Fagundes et al. 2014; Tiwari et al. 2011; Larginho and Baptista 2012). In terms of colorimetric detection, the gold nanoparticles (AuNPs) have been used with DNA molecules for disease diagnoses. In this way, there are diagnostic methods, such as label free and non-cross-linking, which provide easy and fast diagnosis (Larginho and Baptista 2012; Castilho et al. 2015).

The label free is a colorimetric detection for specific sequences and single nucleotide polymorphisms in PCR-amplified genomic DNA which interact with metal nanoparticles based on electrostatics and require no labeling or surface functionalization chemistry. The positive result is obtained when the complementary DNA sequence (cDNA) hybridizes with the PCR-amplified DNA leaving the surface of the

✉ L. Raniero
 Iraniero@univap.br

¹ Laboratório de Nanossensores, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil

² Laboratório de Biocerâmica, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil

³ Laboratório de Bionanotecnologia, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, UNIVAP, Av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos, SP 12244-000, Brazil

APÊNDICE E – CERTIFICADO DE PUBLICAÇÃO



APÊNDICE F – RESUMO APRESENTADO EM CONFERÊNCIA INTERNACIONAL

*Proceedings of the 7th World Congress on New Technologies (NewTech'21)
Prague, Czech Republic Virtual Conference – August, 2021
Paper No. ICNFA 114
DOI: 10.11159/icnfa21.114*

Synthesis and Characterization of Iron Oxide Nanoparticles for Theranostic Applications

Marcela Cândido¹, Nathanne Rost¹, Andrea Campos², Maiara Castilho³ Leandro Raniero¹

¹Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Nanossensores, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000, São José dos Campos, Brazil
marcela.aparecida.candido@gmail.com; nathannerost@gmail.com; Iraniero@univap.br

²Aix Marseille Université, CNRS, Centrale Marseille, FSCM (FR 1739), CP2M 13397 Marseille, França
andrea.campos@univ-amu.fr

³Universidade do Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Bionanotecnologia, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova - 12244-000, São José dos Campos, Brazil
mcastilho@univap.br

Extended Abstract

Iron oxide nanoparticles (IONPs) represent a class of magnetic and biocompatible nanomaterials, which has made important contributions for clinical diagnostics and therapies because of low-cost, viable preparation, and low cytotoxicity [1,3]. The biomedical applications include drug delivery, magnetic separation of labelling cells, development of therapeutic drugs, magnetic hyperthermia for cancer treatment, imaging agents, and others [1,3,5-6]. These nanoparticles exhibit typical superparamagnetic behaviour, with low Curie temperature and high magnetic susceptibility [2]. The chemical coprecipitation is a simple, easy and fast approach applied for synthesizing IONPs [3], in which a precursor aqueous solution containing ferric (Fe^{3+}) and ferrous (Fe^{2+}) ions are alkalized under temperature and pH control. The reproducibility of this synthesis decreases due to parallel reaction pathways inherent in the method, that the formation of intermediate oxides occurs. Therefore, the reaction mechanisms of this chemical route are still the subject of research, but the main iron oxide phases formed are magnetite (Fe_3O_4) and maghemite ($\gamma-Fe_2O_3$) [4].

This work aims to synthesize IONPs by chemical coprecipitation and stabilize the surface with sodium citrate (IONPs@cit). The characterization of nanoparticles were performed by Dynamic Light Scattering, Electron Microscopy, Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FT-IR), X-Ray Diffraction (XRD) and Vibrating Sample Magnetometer (VSM). In order to evaluate the cytotoxicity of IONPs@cit, MTT assay was used to determine the mitochondrial activity in the MDA-MB-468 cell line. Different concentrations of IONPs@cit. were incubated in 1×10^5 cells for 6, 4, 2 hours and 1 hour.

The bare IONPs sedimented after the synthesis process, while the IONPs@cit were colloidal (Zeta Potential -54.0 mV at pH 8.0), however both had shown interaction with an external applied magnetic field (Neodymium magnet). The IONPs and IONPs@cit. were black in color, a factor that indicates the presence of Fe_3O_4 , which was confirmed by FT-IR and XRD analyses. The hydrodynamic diameter values of IONPs and IONPs@cit. were both lower than 100 nm, this value will be compared to the physical diameter. VSM measurements confirmed the nanoparticles superparamagnetism. IONPs@cit had shown a low cytotoxic effect to MDA-MB-468 cells under the investigated conditions. In conclusion, superparamagnetic IONPs were successfully synthesized at the nanoscale and stabilized with sodium citrate, which show a great biocompatibility for biomedical applications.

References

- [1] N. Eyvazzadeh. "Gold-coated magnetic nanoparticle as a nanotheranostic agent for magnetic resonance imaging and photothermal therapy of cancer". *Lasers in medical science*, v. 32, n. 7, p. 1469-1477, 2017.
- [2] T. I. Shabatina. "Magnetic Nanoparticles for Biomedical Purposes: Modern Trends and Prospects". *Magnetochemistry*, v. 6, n. 3, p. 30, 2020.
- [3] T. A. V. Pereira. "Nanopartículas de óxidos de ferro e nióbio com diferentes recobrimentos: síntese, caracterização e avaliação do potencial biológico". Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, 2018.
- [4] A. P. Lagrow. "Unravelling the growth mechanism of the co-precipitation of iron oxide nanoparticles with the aid of synchrotron X-Ray diffraction in solution". *Nanoscale*, v. 11, n. 14, p. 6620-6628, 2019.

- [5] D. Ni. "Magnetic Targeting of Nanotheranostics Enhances Cerenkov Radiation-Induced Photodynamic Therapy". *Journal of the American Chemical Society*, v. 140, n. 44, p. 14971-14979, 2018.
- [6] K. Hola. "Tailored functionalization of iron oxide nanoparticles for MRI, drug delivery, magnetic separation and immobilization of biosubstances". *Biotechnology advances*, v. 33, n. 6, p. 1162-1176, 2015.

Antimicrobial Activity of Nanopharmaceutical on *Klebsiella Pneumoniae* Strains

Inglid Silva¹, Thais Veriato¹, Rafaela Silva¹, Marcela Cândido², Leandro Raniero², Maiara Castilho¹

¹Universidade de Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Bionanotecnologia, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova – 12244-000, São José dos Campos, Brasil

inglidfontoura@hotmail.com, thaissveriato@gmail.com, rafaelamsilva13@hotmail.com, mcastilho@univap.br

²Universidade de Vale do Paraíba/Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Laboratório de Nanossensores, Avenida Shishima Hifumi, 2911, Urbanova – 12244-000, São José dos Campos, Brasil

marcela.aparecida.candido@gmail.com, lraniero@univap.br

Extended Abstract

Klebsiella pneumoniae (*K. pneumoniae*) is an important pathogen responsible for some hospital infections. The raising of the hypervirulent strains has become a public health issue due to increasing of morbidity, mortality and costs associated with infected patients [1, 2]. Current treatment for this infection involves antibiotic therapy, but microorganisms are developing resistance to antimicrobials [2]. Thus, silver nanoparticles (AgNPs) may overcome these limitations due to their bactericidal properties as well as surface functionalization option, which would improve treatments of diseases caused by microorganisms [3, 4]. The aim of this work was to analyze the efficacy of AgNPs functionalized with antibiotics in a strain of *K. pneumoniae* with a resistance profile. The AgNPs were synthesized by the reduction of silver nitrate by sodium borohydride and functionalized to the modified Imipenem antibiotic via carbodiimide chemistry. The nanopharmaceutical was characterized by UV-Visible Spectroscopy and Dynamic Light Scattering. The Minimum Inhibitory Concentration was performed according to Clinical and Laboratory Standards Institute (M7-A9) standards [5]. The MIC and Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of nanopharmaceutical against *K. pneumoniae* with a resistance profile were carried out using optical density values and visible growth occurred on the plates, respectively. The experiments were performed by microdilution method using different concentrations of nanopharmaceutical in a 96-well plate, incubated for 24 h at 35°C and the drop technique was used for MBC. The Surface Plasmon Resonance band for colloidal nanopharmaceutical has shown an absorption at 266 nm and 394 nm, corresponding of antibiotic imipenem and the bare AgNPs, respectively, which are in agreement to an increasing of hydrodynamic diameter for ~36 nm after functionalization procedure. The MIC and MBC analysis showed the bacteriostatic and bactericidal actions of the nanopharmaceutical, showing good results as the lowest concentration was capable of inhibiting bacterial growth. The nanopharmaceutical application has shown great bacterial inhibition power against to *K. pneumoniae*, suggesting a promising treatment for infection of strain with a resistance profile.

References

- [1] S. Navon-Venezia, "Klebsiella pneumoniae: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance". *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, pp. 252–275, 2017.
- [2] E.M. Eichenberger, "Epidemiology and Mechanisms of Resistance of Extensively Drug Resistant Gram-Negative Bacteria", *Antibiotics*, vol. 8, n. 37, 2019.
- [3] G. Franci, "Silver Nanoparticles as Potential Antibacterial Agents" *Molecules*, v. 20, p. 8856-8874, 2015.
- [4] LI, W.R., "Antibacterial effect of silver nanoparticles on *Staphylococcus aureus*", *Biometals*, v. 24, p. 135-141, 2011.
- [5] CLSI. "Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard-Ninth Edition". CLSI document M07-A9. Wayne, PA: *Clinical and Laboratory Standards Institute*; 2012.



Exploring & Connecting Science
(649 Mission St. 5th Floor, San Francisco, CA 94105)

5th Edition of
Nanotechnology, Nanomedicine & Material Science Hybrid Conference

Young Research Forum

Prof/Dr/Ms. **Marcela Aparecida Cândido**

Vale do Paraíba University, Brazil



for her oral presentation entitled

**Theranostic characterization of breast cancer treated with
nanoprobes, and thermal ablation therapy**

*at the 5th Edition of Nanotechnology,
Nanomedicine & Material Science Hybrid Conference
held during October 06-07 2022 | Paris, France*

Analysis of the diagnostic potential of nanosensors in breast cancer 3D tumor**Paula Fonseca Antunes Vieira^{1*}, Viviane Paula dos Santos Jesus¹, Marcela Aparecida Cândido¹ and Leandro Raniero²**¹Vale do Paraíba University, Brazil²Research Professor and currently Research Dean at Vale do Paraíba University, Brazil

Over expression of the Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) has been associated with malignancies with a worse prognosis, and the EGF protein activates its signaling pathways, which regulate cellular functions. As a result, the EGFR receptor is being investigated for a wide range of tumor diagnostics, encouraging the development of novel methods to improve quality and efficiency. Nanomaterials can recognize cancer cells by targeting certain biochemical pathways, highlighting nanomedicine's potential. Three-dimensional (3D) cell culture has arisen as an alternative to in vivo experiments for the formation of a heterogeneous microenvironment and the representativeness of the cellular mechanisms present in malignancies. Cell-cell and cell-extracellular matrix interaction is enhanced in 3D cell culture, preserving tissue shape and structure. In this regard, among the several types of 3D environment development that are conceivable, micro molded agarose allows large-scale reproducibility. In this study, breast cancer spheroids were created on micro molded agarose by the MDA-MB-468 strain. By functionalizing the EGF protein and Chlorine e6 (Ce6) in gold nanoparticles, the nanosensors were synthesized and applied to the spheroids for the detection of EGFR. The EGF protein is delivered to the EGFR receptor through active targeting, and Ce6 serves as a fluorescent flag molecule. The tumors were cultivated for 21 days after being cast in 2% agarose molds. Flow cytometry was used to detect the presence of fluorescence and the cell death pathways after the nanosensors were applied. Annexin V (AnnV) and propidium iodide (PI) staining were used to assess cell death pathways in viable (AnnV- PI-), apoptotic (AnnV+ PI-), and necrotic (AnnV+ PI+) cells. The characterization of this tissue reveal the presence of fluorescence and the absence of substantial apoptosis and necrosis deaths.



Exploring & Connecting Science
(649 Mission St. 5th Floor, San Francisco, CA 94105)

5th Edition of
Nanotechnology, Nanomedicine & Material Science Hybrid Conference

Poster Presentation

Prof/Dr/Ms. Paula Fonseca Antunes Vieira

Paraiba University, Brazil

for presenting the poster entitled
Analysis of the diagnostic potential of nano sensors in Breast Cancer 3D tumor

*at the 5th Edition of Nanotechnology,
Nanomedicine & Material Science Hybrid Conference
held during October 06-07 2022 | Paris, France*

APÊNDICE G – RESUMO APRESENTADO EM CONFERÊNCIA NACIONAL.

Verifique o código de autenticidade 2326764.0742188.734825.8.58343104182774517897 em <https://www.even3.com.br/documentos>

 **Univap**
Universidade do Vale do Paraíba

I Simpósio de Engenharia Biomédica do Vale do Paraíba

Avanços Tecnológicos na Área da Saúde

Certificamos que o trabalho intitulado **NANOSSONDAS TERNÓSTICAS PARA DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA** de autoria de **Marcela Aparecida Cândido, Paula Fonseca Antunes Vieira, Virginia Rezende Ferreira, CRISTINA Pacheco SOARES e Leandro Raniero**, foi aceito para apresentação e publicação nos anais do **I Simpósio de Engenharia Biomédica do Vale do Paraíba**, realizado na Universidade do Vale do Paraíba.

São José dos Campos, 11 de Novembro de 2022.


Prof.ª Dr.ª Maiara Lima Castilho
Cordenadora geral do I SEBVaP

ISBN Nº 978-65-88226-08-7

Verifique o código de autenticidade 2326764.0343399.734894.8.58343105155664517717 em <https://www.even3.com.br/documentos>

 **Univap**
Universidade do Vale do Paraíba

I Simpósio de Engenharia Biomédica do Vale do Paraíba

Avanços Tecnológicos na Área da Saúde

Certificamos que o trabalho intitulado **ANÁLISE DE FLUORESCÊNCIA E VIABILIDADE CELULAR APÓS APLICAÇÃO DE NANOSSENSORES EM ESFEROIDES DE CÂNCER DE MAMA** de autoria de **Paula Fonseca Antunes Vieira, Viviane Paula dos Santos Jesus, Marcela Aparecida Cândido, CRISTINA Pacheco SOARES e Leandro Raniero**, foi aceito para apresentação e publicação nos anais do **I Simpósio de Engenharia Biomédica do Vale do Paraíba**, realizado na Universidade do Vale do Paraíba.

São José dos Campos, 11 de Novembro de 2022.


Prof.ª Dr.ª Maiara Lima Castilho
Cordenadora geral do I SEBVaP

ISBN Nº 978-65-88226-08-7



XXVI Inic
Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica

XXII EPG
Encontro Latino Americano
de Pós-Graduação

XVI Inic Jr
Encontro Latino Americano
de Iniciação Científica Júnior

XII Inid
Encontro Nacional
de Iniciação à Docência

II Enexun
Encontro Nacional de
Extensão Universitária



CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "INFLUÊNCIA DOS PARÂMETROS DE DILUIÇÃO DA CURCUMINA NO ESPECTRO UV-VISÍVEL" de autoria de Virginia Rezende Ferreira, Marcela Aparecida Cândido e Leandro José Raniero, foi apresentado no XXVI Encontro Latino Americano de Iniciação Científica (XXVI INIC), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 19, 20 e 21 de outubro de 2022.



São José dos Campos, 21 de outubro de 2022.

Prof. Dr. Leandro José Raniero
Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa

Realização: **Univap**
Universidade do Vale do Paraíba

FVE FUNDAÇÃO
VALEPARAIBANA
DE ENSINO

Apoio: **CNPq**

FAPESP

CAPEL

Univap

CERTIFICADO

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

III CDNB

Certificamos que **Marcela Aparecida Cândido** apresentou o trabalho intitulado **Determinação da via de morte celular obtida por SPIONs com terapia fototérmica** de autoria de Marcela Aparecida Cândido, Paula Fonseca Antunes Vieira, Cristina Pacheco-Soares, Leandro Raniero no **III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (III CDNB)** organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no período de 07 a 10 de junho de 2022.

Luciano Paulino da Silva
LUCIANO PAULINO DA SILVA
Coordenador da Comissão
Organizadora do III CDNB
Pesquisador Embrapa

CERTIFICADO

APRESENTAÇÃO DE TRABALHO

III CDNB

Certificamos que Paula Fonseca Antunes Vieira apresentou o trabalho intitulado **Caracterização do microambiente tumoral de mama 3D desenvolvido em agarose micro moldada** de autoria de Paula Fonseca Antunes Vieira, Marcela Aparecida Cândido, Cristina Pacheco-Soares, Leandro Raniero no **III Congresso Digital de Nanobiotecnologia e Bioengenharia (III CDNB)** organizado pela Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia no período de 07 a 10 de junho de 2022.

Luciano Paulino da Silva
LUCIANO PAULINO DA SILVA
Coordenador da Comissão
Organizadora do III CDNB
Pesquisador Embrapa





ICONNANO

CERTIFICATE
POSTER PRESENTATION

We certify that the scientific paper entitled "**The Cytotoxicity of the Water-Based Suspension of Iron Oxide Nanoparticles Stabilized by Sodium Citrate**", authored by **Marcela A. Cândido, Paula F. A. Vieira, Nathanne C. V. Rost, Giulia C. Gonçalves, Maiara L. Castilho, Leandro Raniero**, was presented as a poster, at the Second International Conference of Nanoscience and Nanobiotechnology, which took place virtually on May, 26th - 28th, 2021.

May 28th, 2021.

Ricardo Bentes Azevedo

Ricardo Bentes de Azevedo
Chairman of the Organizing Committee

analityca Agilent CNPq CAPES SPECTRAi nno FOTOCHEMIA UNESP FOCOS

2021 ONLINE



ICONNANO

CERTIFICATE
POSTER PRESENTATION

We certify that the scientific paper entitled "**Cytotoxicity Study Of Iron Oxide Nanoparticles Stabilized With Sodium Citrate On Brain Tumour Cells**", authored by **Marcela Aparecida Cândido, Vitor Gabriel Poli De Lima, Maiara Lima Castilho, Leandro Raniero**, was presented as a poster, at the Second International Conference of Nanoscience and Nanobiotechnology, which took place virtually on May, 26th - 28th, 2021.

May 28th, 2021.

Ricardo Bentes Azevedo

Ricardo Bentes de Azevedo
Chairman of the Organizing Committee

analityca Agilent CNPq CAPES SPECTRAi nno FOTOCHEMIA UNESP FOCOS

2021 ONLINE



ICONNANO

CERTIFICATE

POSTER PRESENTATION

We certify that the scientific paper entitled "**Study Of The Interaction Between Platinum Molecule With Purine Bases By Ft-Ir**", authored by **Vitor Gabriel Poli De Lima, Marcela Aparecida Cândido, Maiara Lima Castilho, Leandro Raniero**, was presented as a poster, at the Second International Conference of Nanoscience and Nanobiotechnology, which took place virtually on May, 26th - 28th, 2021.

May 28th, 2021.

Ricardo Bentes Azevedo

Ricardo Bentes de Azevedo
Chairman of the Organizing Committee



2021 ONLINE





ENCONTRO DE OUTONO 2021
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FÍSICA
CERTIFICATE

The Organizing Committee hereby certifies that the work "Synthesis and characterization study of iron oxide nanoparticles and core-shell with gold" by **Marcela Aparecida Cândido, Nathanne Cristina Vilela Rost, Vitor Gabriel Poli de Lima, Maiara Lima Castilho, Leandro Raniero** was presented in the session **NANOMATERIALS** of the Encontro de Outono da SBF 2021, which took place in São Paulo, SP - Online from June 21 to 25, 2021.

São Paulo, SP - Online, June 25, 2021



Rodrigo Gonçalves Pereira
Rodrigo Gonçalves Pereira
Coordenador



XXIV INIC
XX EPG
III CONPAT
XXIV INIC Jr
XV INID



SOCIEDADE EM REDE:

**EDUCAÇÃO, PESQUISA E
DESAFIOS NOS TEMPOS ATUAIS**

21, 22 e 23 de outubro de 2020

Evento online
www.inicepg.univap.br

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho intitulado "ESTUDO DA ESTABILIDADE DE NANOPARTÍCULAS DE ÓXIDO DE FERRO." de autoria de Marcela Aparecida Cândido, Vitor Gabriel Poli de Lima, Nathanne Cristina Vilela Rost, Priscila Maria Sarneiro Correia Marciano Leite, Maiara Lima Catilho e Leandro Raniero, foi apresentado no XX Encontro Latino Americano de Pós-Graduação (XX EPG), realizado na Universidade do Vale do Paraíba, nos dias 21, 22 e 23 de outubro de 2020.

São José dos Campos, 23 de outubro de 2020.


 Prof. Dr. Leandro José Raniero
 Pró-reitor de Pós-graduação e Pesquisa



Parceiros:






Realização:





FUNDAÇÃO
VALEPARAIBANA
DE ENSINO

Characterization of IONPs stabilized by sodium citrate

M. A. (Cândido)¹, N. C. V. (Rost)¹, O. O. (Comparato Filho)¹, P. M. S. C. M. (Leite)², P. (Carneiro)⁴, M. L. (Castilho)³, M. C. S. (Pereira)⁴ and L. (Raniero)*¹

¹Laboratório de Nanossensores, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil (Iraniero@univap.br)

²Central de Laboratórios Multiusuários, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil

³Laboratório de Bionanotecnologia, IP&D – Universidade do Vale do Paraíba, Brazil

⁴LEPABE, Dep. Eng. Química, Fac. Eng. Univ. do Porto, R. Dr. Roberto Frias, 42, 4200-072 Porto – Portugal.

INTRODUCTION

Iron oxide nanoparticles (IONPs), owing to superparamagnetic properties, had been of interest for Magnetic Resonance Imaging and Magnetic Particle Imaging, magnetic fluid hyperthermia and controlled drug release¹. Among the chemical routes to produce IONPs, coprecipitation in alkaline media, first proposed by Massart (1981), enables high nanoparticles production in a simple, easy and quick way². In this work, IONPs were synthesized by coprecipitation and the effects of the stabilizer sodium citrate on hydrodynamic and physical diameter and Zeta Potential were investigated.

EXPERIMENTAL STUDY

The synthesis protocol of IONPs was adapted from Mérida and collaborators (2015)³. A mixture containing iron (II) and iron (III) was prepared in deionized water, in molar ratio 1:2, and the processes were made under inert atmosphere, 250 rpm and 85 °C. The precipitation of the iron oxides occurred through addition of 35 mL of ammonium hydroxide 28% v/v and the pH was maintained between 8 and 9 during the reaction. Then, the magnetic solution was centrifuged at 1,500 rpm for 10 min, the supernatant was discarded and a solution of sodium citrate (1 mol L⁻¹) was added. The final product was ultrasonicated until achieve a total energy of 70 kJ, centrifuged at 1,800 rpm for 10 min and the black paste dried in air overnight.

RESULTS AND DISCUSSION

The hydrodynamic diameters measured by Dynamic Light Scattering (DLS) of the IONPs (without stabilizer) and IONPs@cit (with stabilizer) are presented in Fig. 1.

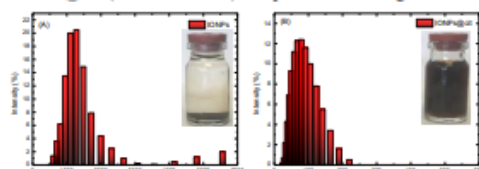


Fig. 1: Size distribution of (A) IONPs and (B) IONPs@cit. DLS indicated a size of 1,283 nm with polydispersity index (Pdl) 0.151 for IONPs, which demonstrates the presence of aggregates and a broad size distribution. On the other hand, IONPs@cit had shown a diameter of 69.70 nm and Pdl 0.170, confirming that citrate ions improve the size distribution and dimensions at nanoscale range. Moreover, whilst the Zeta Potential of IONPs was

found to be -35.5 mV, sedimentation of this sample was observed as shown in Fig. 1(A). IONPs@cit presented a value of -48 mV at pH 8, which is highly stable. The micrograph obtained by SEM-FEG, illustrated in Fig. 2, shows the spheres-like nanoparticles morphology of IONPs@cit. The physical size distribution was obtained by using ImageJ version 1.48 (NIH). Therefore, at least 500 nanoparticles were considered in this analysis, with aspect ratio ≤ 1.6 and the average size was found to be 13.5 ± 0.25 nm. Once DLS is sensitive to aggregates, whereas SEM-FEG images individual particles, a difference between the hydrodynamic and physical diameters of the nanoparticles was observed.

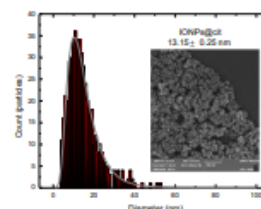


Fig. 2: SEM-FEG micrograph of IONPs size distribution.

CONCLUSION

In this work, IONPs were successfully synthesized by coprecipitation and stabilized by sodium citrate, as confirmed by Zeta Potential analysis and considering that no sedimentation was observed over time on IONPs@cit. The data also suggested that citrate ions improves nanoparticles size distribution and average diameter, as well as colloidal stability.

REFERENCES

1. E. Fuller, et al. ACS Appl. Polym. Mater. 1, 211–220 (2019).
2. R. Massart. IEEE transactions on magnetics, 17, 2, 1247-1248 (1981).
3. F. Mérida, et al. Journal of magnetism and magnetic materials, 394, 361-371 (2015).

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank the Brazilian agencies CAPES for the PhD scholarships (code 001, process number 8881.361771/2019-01), FAPESP (Project 2017/07519-2), CNPq (302944/2018-4), and FINEP (Conv. 01.18.0053.00). Also, the authors are grateful to “Laboratório Labas dimare - INPE (Laboratório de diamantes e materiais relacionados)” for SEM-FEG analyses and “Laboratório de Cerâmicas Avançadas-UNIVAP/IP&D” for providing access to probe sonicator.

APÊNDICE H – PREMIAÇÕES



IC 2021
NFA

BEST PAPER AWARD

CERTIFICATE

The 12th International Conference on Nanotechnology:
Fundamentals and Applications (ICNFA'21)

August 5, 2021 - August 7, 2021 | Virtual Conference

We proudly present this to

Marcela Cândido

for the paper titled:

*Antimicrobial Activity of Nanopharmaceutical on Klebsiella
Pneumoniae Strains*



*Akshada
Raju*

Akshada Raju
Conference Coordinator

