



Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências

**SAULO BRIVALDO MENDONÇA DA SILVA**

**PREPARAÇÃO DE MATRIZ MAGNÉTICA COM POTENCIAL  
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Recife  
2022

SAULO BRIVALDO MENDONÇA DA SILVA

**PREPARAÇÃO DE MATRIZ MAGNÉTICA COM POTENCIAL  
APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Paola Cabrera.

Coorientador: Dr. Wesley Felix de Oliveira.

Recife  
2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Silva, Saulo Brivaldo Mendonça da.

Preparação de matriz magnética com potencial aplicação em terapia  
fotodinâmica / Saulo Brivaldo Mendonça da Silva. - Recife, 2022.  
52 : il., tab.

Orientador(a): Mariana Paola Cabrera

Coorientador(a): Wesley Felix de Oliveira

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de  
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2022.

1. Azul de metileno. 2. Óxido de ferro. 3. PSSS. 4. Nanoestrutura. 5.  
Ferramenta terapêutica . I. Cabrera, Mariana Paola. (Orientação). II. Oliveira,  
Wesley Felix de. (Coorientação). III. Título.

610 CDD (22.ed.)

SAULO BRIVALDO MENDONÇA DA SILVA

# **PREPARAÇÃO DE MATRIZ MAGNÉTICA COM POTENCIAL APLICAÇÃO EM TERAPIA FOTODINÂMICA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito à obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: 24/11/2022

## **BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariana Paola Cabrera  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Química Fundamental

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Adriana Fontes  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Biofísica e Radiobiologia

---

MSc. Bruna Pereira da Silva  
Universidade Federal de Pernambuco/ Departamento de Farmácia

Dedico este trabalho aos meus pais que sempre fizeram o impossível para que eu tivesse oportunidades, e também por sempre acreditarem em mim e me encorajarem a seguir trilhando meus caminhos e alcançando meus objetivos.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a minha orientadora Profa. Dra. Mariana Paola Cabrera, pelos ensinamentos ao longo desse ano, pelo voto de confiança, apoio e, principalmente, pela enorme paciência durante o desenvolvimento e execução do projeto. Agradeço também ao meu coorientador Dr. Wesley Felix de Oliveira, pela paciência e pelo acompanhamento durante os experimentos no laboratório.

Agradeço ao grupo de pesquisa em Nanotecnologia Biomédica (NanoBio), em especial aos professores Dr. Paulo Euzébio e Dra. Adriana Fontes pela oportunidade que me foi concedida de fazer parte de um grupo repleto de pessoas afetuosas e atenciosas. Agradeço também a João Victor Lima por todas as dicas, suporte, acompanhamento durante a execução dos experimentos e, também, pela paciência durante esse período.

Gostaria de agradecer também a todos os meus amigos da UFPE que me ajudaram a viver e aproveitar o ambiente da universidade. Sou grato por cada risada e desabafo nos momentos de aflição durante esses anos de graduação.

Agradeço também aos meus familiares, principalmente aos meus pais Benigre Brivaldo e Sandra Mendonça e a minha avó Antônia Maria por serem exemplos de pessoas que desde muito cedo sempre lutaram para conseguir o que queriam e que, mesmo diante de tudo que passaram na vida, continuaram sendo pessoas íntegras e amorosas.

“Um passo à frente e você já não está mais no mesmo lugar.”

**- Chico Science**

SILVA, Saulo Brivaldo Mendonça da. **Preparação de Matriz Magnética com Potencial Aplicação em Terapia Fotodinâmica**. 2022. 52. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

## RESUMO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma técnica em que são utilizados oxigênio, fotossensibilizador e uma fonte de luz para gerar espécies reativas de oxigênio que atacam e destroem as células-alvo, produzindo um efeito biológico favorável ao tratamento de algum distúrbio como infecção bacteriana ou câncer. Um dos fotossensibilizadores que podem ser utilizados é o azul de metileno (AM), uma molécula orgânica com baixa toxicidade e que pode ser associada com nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONs) para melhorar o efeito da TFD devido à habilidade das SPIONs de serem manipuladas por meio de um campo magnético externo. Para não agregarem, as SPIONs podem ser funcionalizadas com o poli (4-estireno sulfonato de sódio) (PSSS), um polímero que oferece estabilidade coloidal às SPIONs. Forma-se, então, um sistema com propriedades fotoquímicas e superparamagnéticas para melhorar os efeitos biológicos favoráveis da TFD. O objetivo do trabalho consistiu em desenvolver uma nanoplataforma baseada em AM conjugado às SPIONs funcionalizadas com PSSS (SPIONs@PSSS-AM) com potencial terapêutico na TFD. Primeiramente, as SPIONs foram obtidas em fase aquosa pelo método de coprecipitação alcalina. Após isso, o processo de modificação de superfície das SPIONs com o PSSS foi investigado realizando um estudo quimiométrico para que fossem decididas as condições experimentais que norteariam o trabalho. Os experimentos principais consistiram na investigação da concentração das SPIONs e do PSSS, além do tempo de contato entre os reagentes e a temperatura. Ao final, foram realizadas medidas de potencial zeta e espectroscopia UV-Vis para a caracterização das nanoplataformas. Os resultados do estudo quimiométrico mostraram que a melhor amostra foi a que apresentou o potencial zeta mais negativo, sendo de -37,7 mV e, assim, o trabalho foi realizado seguindo as condições experimentais desta amostra. Este valor de potencial zeta indicou que houve a funcionalização efetiva com o polímero. Por outro lado, após adição do AM o valor do potencial zeta das amostras tornou-se mais positivo, ficando próximo de -22 mV e indicando que houve conjugação com o AM. Na espectroscopia UV-Vis, foi possível observar que a amostra que utilizou uma menor concentração de PSSS (0,5%) e ficou em contato por menos tempo (3 dias) apresentou uma maior quantidade de AM adsorvido em relação às demais, pois além de apresentar um espectro de absorção satisfatório, não houve a formação de dímeros. No presente trabalho foram obtidas matrizes magnéticas com capacidade de conjugação de AM de 89,6% e 90,2%. Além disso, os espectros das amostras no infravermelho indicaram a presença do AM nas mesmas, indicando mais uma vez que o processo de conjugação aconteceu de forma satisfatória. Com isso, é possível concluir que houve o desenvolvimento de uma nanoplataforma com potencial terapêutico para a TFD, sendo necessários estudos posteriores para investigar a eficiência do sistema.

**Palavras-chave:** Azul de metileno. Óxido de ferro. PSSS. Nanoestrutura. Ferramenta terapêutica.

SILVA, Saulo Brivaldo Mendonça da. **Preparation of a Magnetic Matrix with Potential Application in Photodynamic Therapy**. 2022. 52. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2022.

### ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a technique in which oxygen, a photosensitizer and a light source are used to generate reactive oxygen species that attack and destroy target cells, producing a biological effect favorable to the treatment of some disorder such as bacterial infection or cancer. One of the photosensitizers that can be used is methylene blue (MB), an organic molecule with low toxicity and that can be associated with superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) to improve the effect of PDT due to the ability of SPIONs to be manipulated by means of an external magnetic field. In order not to aggregate, SPIONs can be functionalized with poly (sodium 4-styrene sulfonate) (PSSS), a polymer that offers colloidal stability to SPIONs. A system is then formed with photochemical and superparamagnetic properties to enhance the favorable biological effects of PDT. The objective of this work was to develop a nanoplatform based on MB combined with SPIONs functionalized with PSSS (SPIONs@PSSS-MB) with therapeutic potential in PDT. First, the SPIONs were obtained in the aqueous phase by the alkaline coprecipitation method. After that, the surface modification process of SPIONs with PSSS was investigated by carrying out a chemometric study so that the experimental conditions that guided the work could be decided. The main experiments consisted of investigating the concentration of SPIONs and PSSS, in addition to the contact time between the reagents and the temperature. At the end, measurements of zeta potential and UV-Vis spectroscopy were performed to characterize the nanoplatforms. The results of the chemometric study showed that the best sample was the one that presented the most negative zeta potential, being -37,7 mV and, thus, the work was carried out following the experimental conditions of this sample. This zeta potential value indicated that there was effective functionalization with the polymer. On the other hand, after adding MB, the zeta potential value of the samples became more positive, getting close to -22 mV, indicating that there was conjugation with MB. In the UV-Vis spectroscopy, it was possible to observe that the sample that used a lower concentration of PSSS (0,5%) and was in contact for a shorter time (3 days) presented a greater amount of MB adsorbed in relation to the others, because in addition to despite presenting a satisfactory absorption spectrum, there was no formation of dimers. In the present work, magnetic matrices with MB conjugation capacity of 89,6% and 90,2% were obtained. In addition, the infrared spectra of the samples indicated the presence of MB in them, indicating once again that the conjugation process took place satisfactorily. With this, it is possible to conclude that a nanoplatform with therapeutic potential for PDT was developed, requiring further studies to investigate the efficiency of the system.

**Keywords:** Methylene blue. Iron oxide. PSSS. Nanostructure. Therapeutic tool.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Mecanismo de ação da reação fotodinâmica. ....	15
<b>Figura 2</b> - Características da apoptose, autofagia e necrose em uma célula qualquer. .....	16
<b>Figura 3</b> - Estrutura química dos fotossensibilizadores. ....	18
<b>Figura 4</b> - Estrutura molecular do azul de metileno e de seu dímero. ....	19
<b>Figura 5</b> - Representação esquemática de uma partícula superparamagnética.....	22
<b>Figura 6</b> - Processo de separação magnética, onde o ímã é aplicado na parede do tubo contendo uma solução com nanopartículas magnéticas (bolas vermelhas). Após a separação pelo ímã, o sobrenadante contendo partículas não magnéticas (bolas verdes) é retirado da solução. ....	23
<b>Figura 7</b> - Estrutura química do poli (4-estireno sulfonato de sódio). ....	25
<b>Figura 8</b> - Ferrofluido em fase aquosa.....	33
<b>Figura 9</b> - Espectro de absorção do AM na concentração de $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .....	37
<b>Figura 10</b> - Espectros de absorção das amostras A5 (em vermelho), A7 (em verde) e AM (em azul).....	38
<b>Figura 11</b> - Espectros de absorção das amostras A6 (em vermelho) e A8 (em verde) e AM (em azul). ....	39
<b>Figura 12</b> - Curva de calibração do AM. ....	40
<b>Figura 13</b> - Espectros do infravermelho das amostras A5, A7, PSSS e AM.....	41

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Variáveis e níveis de experimentos para o planejamento fatorial fracionário $2^{3-1}$ .....	28
<b>Tabela 2.</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{3-1}$ .....	28
<b>Tabela 3.</b> Condições experimentais no processo de conjugação do AM com as SPIONs-PSSS.....	29
<b>Tabela 4.</b> Condições experimentais no processo de conjugação do AM com as SPIONs-PSSS.....	30
<b>Tabela 5.</b> Processo de modificação de superfície das SPIONs com AM. ....	31
<b>Tabela 6.</b> Condições experimentais no processo de otimização da conjugação do AM com as SPIONs-PSSS. ....	32
<b>Tabela 7.</b> Matriz do planejamento fatorial fracionário $2^{3-1}$ e valores de potencial zeta. ....	34

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TFD	Terapia fotodinâmica
FS	Fotossensibilizador
EROS	Espécies reativas de oxigênio
AM	Azul de metileno
NPs	Nanopartículas
Ag	Prata
SPIONs	Nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (do inglês <i>superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i> )
PSSS	Poli (4-estireno sulfonato de sódio)
O <sub>2</sub>	Oxigênio
( <sup>1</sup> FS*)	Fotossensibilizador no estado singleto excitado
( <sup>3</sup> FS*)	Fotossensibilizador no estado tripleto excitado
( <sup>3</sup> O <sub>2</sub> )	Oxigênio no estado tripleto
( <sup>1</sup> O <sub>2</sub> )	Oxigênio no estado singleto
BCL-2	Linfoma de células B 2 (do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i> )
BAX	Proteína X associada ao BCL-2 (do inglês <i>Bcl-2 Associated X-protein</i> )
ULK1	Complexo quinase 1 de ativação de autofagia semelhante a unc-51
LED	Light-emitting diode
LIP	Luz intensa pulsada
O-H	Ligação oxigênio-hidrogênio
ALA	Ácido 5-aminolevulínico
DNA	Ácido desoxirribonucleico
Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub>	Magnetita
T <sub>b</sub>	Temperatura de bloqueio
ZFC	Campo magnético zero
T <sub>c</sub>	Temperatura de Curie
PCL	Policaprolactona
PLGA	Poli(lactídeo-co-glicólico)
PEG	Polietilenoglicol
S	Enxofre
FDA	Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês <i>Food and Drug Administration</i> )

ZIKV

Zika vírus

Ni<sup>2+</sup>

Níquel

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO .....	12
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	13
2.1	TERAPIA FOTODINÂMICA.....	13
2.1.1	Mecanismo de ação .....	14
2.1.2	Componentes .....	16
2.1.2.1	Fonte de luz.....	16
2.1.2.2	Oxigênio .....	17
2.1.2.3	Fotossensibilizador.....	17
2.2	NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS .....	20
2.3	FUNCIONALIZAÇÃO DAS SPIONS.....	23
2.4	POLI (4-ESTIRENO SULFONATO DE SÓDIO) .....	24
3.	OBJETIVOS .....	26
3.1	OBJETIVO GERAL.....	26
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	26
4.	METODOLOGIA.....	27
4.1	SÍNTESE DAS SPIONS .....	27
4.2	PREPARAÇÃO DAS SPIONS COM PSSS.....	27
4.3	CONJUGAÇÃO DO AM COM AS SPIONS-PSSS .....	29
4.4	OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA SPIONS-PSSS-AM .....	30
4.5	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	33
5.1	SÍNTESE DAS SPIONS .....	33
5.2	PREPARAÇÃO DAS SPIONS COM PSSS.....	33
5.3	CONJUGAÇÃO DO AM COM AS SPIONS-PSSS.....	34
5.4	AVALIAÇÃO ÓPTICA DOS SISTEMAS .....	36
5.5	CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS.....	41
6	CONCLUSÃO.....	43
	REFERÊNCIAS .....	44

## 1. INTRODUÇÃO

A terapia fotodinâmica (TFD) é uma tecnologia baseada na fotoconversão induzida de uma molécula sensível à luz (fotossensibilizador - FS) capaz de desencadear a produção de espécies reativas de oxigênio (EROS) (ISSA; MANELA-AZULAY, 2010; KWIATKOWSKI *et al.*, 2018). Essa técnica pode ser empregada para diferentes processos como remoção de bactérias causadoras da periodontite, além de auxiliar no tratamento de glioblastomas, câncer da bexiga, doença de Bowen e carcinoma de células basais (HUANG, 2005; RAJESH *et al.*, 2011; MATOBA *et al.*, 2018).

Várias moléculas podem ser utilizadas como agentes fotosensibilizantes para que a reação fotodinâmica aconteça, destacando-se o azul de metileno (AM), uma vez que este corante orgânico apresenta baixa toxicidade, baixo custo e elevada eficiência fotodinâmica (TEICHERT *et al.*, 2002; JESUS *et al.*, 2018). Além disso, a alta afinidade do AM pela melanina faz com que ele tenha vantagem sobre outras substâncias utilizadas para o mesmo propósito, uma vez que o AM é acumulado em células de melanoma e, quando inserido nessas células neoplásicas o AM funciona como uma fonte localizada de radiação, podendo ser utilizado tanto para o diagnóstico, quanto para a terapia de melanoma disseminado (LINK, 1999; WAGNER *et al.*, 2012).

Um exemplo bem sucedido da aplicação do AM na TFD é apresentado por Eun Jin Lim e colaboradores (2013), em que células de adenocarcinoma do pulmão (células A549) sofreram apoptose após tratamento pelo AM excitado por uma fonte de luz, demonstrando o potencial desse composto como um fotossensibilizador. Ademais, foi observado que a forma com que o AM contribui para a apoptose das células A549 quando associado à TFD consiste, entre outras coisas, na ativação de caspase, redução do potencial da membrana mitocondrial e geração de EROS (LIM *et al.*, 2013).

Devido a sua carga positiva, o AM pode interagir com outras estruturas através de interações eletrostáticas. A combinação do AM com outros materiais, incluindo as nanopartículas (NPs), pode desencadear melhorias significativas em suas propriedades fotoquímicas e atividades biológicas, como demonstrado por Rodrigues e colaboradores (2021). Neste trabalho, os autores fizeram um sistema baseado em AM conjugado com NPs de prata (Ag) que se demonstrou eficiente contra cepas de *Staphylococcus aureus*, exibindo maior eficiência fotodinâmica que o AM sozinho (RODRIGUES *et al.*, 2021).

Além das NPs de Ag, o AM pode ser conjugado com as NPs superparamagnéticas de óxido de ferro (do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles* - SPIONs). Essas NPs são bastantes versáteis, já que podem ser manipuladas facilmente por um campo magnético externo. Dessa forma, quando as SPIONs são estimuladas magneticamente de forma alternada, o seu deslocamento é vetorizado, podendo induzir a formação de calor no local. Portanto, essas NPs têm sido bastante utilizadas para tratamentos hipertérmicos de diferentes disfunções homeostáticas (MAHMOUDI *et al.*, 2011; JOSE *et al.*, 2020).

Embora as SPIONs sejam bastantes eficientes, quando entram em contato com sistemas biológicos, as NPs tendem a formar agregados, podendo ter algumas das suas propriedades prejudicadas. Por esse motivo, torna-se interessante que as SPIONs sejam funcionalizadas com algum polímero capaz de auxiliar no aprimoramento da sua estabilidade coloidal, como por exemplo, o poli (4-estireno sulfonato de sódio), aqui abreviado para PSSS (TADA *et al.*, 2007; LEI; LI; WEI, 2008; BRITO *et al.*, 2019). Além de aumentar a estabilidade das SPIONs, esse polieletrólito fornece carga negativa para as NPs, possibilitando que as SPIONs modificadas com o PSSS (SPIONs-PSSS) e o AM interajam entre si por intermédio das suas cargas de superfície (YEAP *et al.*, 2015).

A combinação entre as SPIONs funcionalizadas com o PSSS e o AM resulta em um sistema com propriedades fotoquímicas e superparamagnéticas. Sendo assim, esse sistema pode ser empregado em TFD e até mesmo em tratamentos hipertérmicos, otimizando o processo terapêutico (FUDIMURA *et al.*, 2017; LIM, 2021).

Com base no que foi exposto, o objetivo deste trabalho é desenvolver uma nanoplataforma baseada em AM conjugado às SPIONs funcionalizadas com PSSS (SPIONs-PSSS-AM) com potencial terapêutico na TFD.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 TERAPIA FOTODINÂMICA**

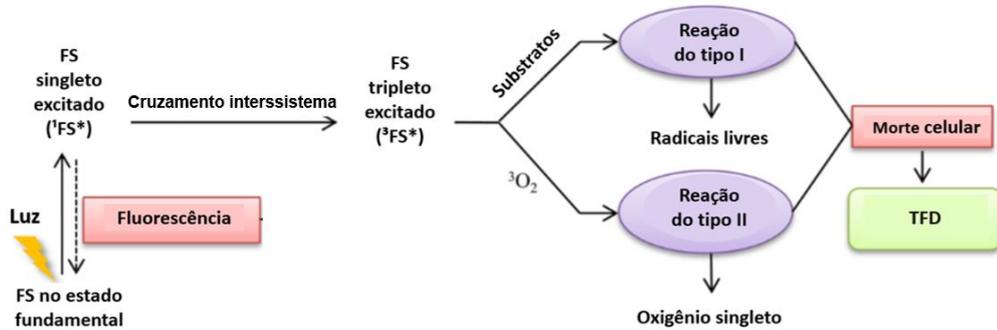
A TFD consiste na sinergia de componentes como a luz, o fotossensibilizador e o oxigênio (O<sub>2</sub>) para obter o efeito biológico desejado, em outras palavras, a morte celular. Primeiramente tem-se a excitação de um FS pela luz e, depois, há a interação

do FS excitado com o O<sub>2</sub> (CHILAKAMARTCHI; GIRIBABU, 2017; COSTA *et al.*, 2019) A excitação do FS resulta na formação de EROS que interagem com estruturas fundamentais da célula-alvo, ocasionando necrose ou apoptose e sendo a irradiação limitada a uma região específica (DONOHOE *et al.*, 2019; WARRIER *et al.*, 2020).

### 2.1.1 Mecanismo de ação

A reação fotodinâmica acontece quando os elétrons do FS são excitados por fótons (energia eletromagnética) capazes de promover transições eletrônicas, fazendo com que o FS saia do estado singleto fundamental para o singleto excitado (<sup>1</sup>FS\*), isto é, estado curto tempo de vida. Esse fotossensibilizador ativo pode emitir fluorescência e voltar para o estado fundamental ou pode sofrer um cruzamento intersistema. Nesta última situação, há uma mudança na multiplicidade do spin em que o FS é promovido do estado de singleto excitado para o estado tripleto excitado (<sup>3</sup>FS\*), sendo um estado de tempo de vida mais longo. A transição do elétron do FS para o estado tripleto excitado pode ocasionar duas reações: a do tipo 1, onde o FS vai interagir diretamente com o substrato e transferir um próton - formando um radical ânion, ou um elétron - formando um radical cátion. Na presença de oxigênio, esses radicais formam produtos oxigenados como peróxido de hidrogênio, radicais de ânion superóxido e radicais hidroxila. Na reação de tipo 2 há transferência de energia do fotossensibilizador excitado para uma molécula de oxigênio, o que faz com que essa molécula de O<sub>2</sub> saia do estado de tripleto (<sup>3</sup>O<sub>2</sub>) para o estado singleto (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>). Ao final das reações de tipo 1 e 2 são formados os bioprodutos responsáveis pelo efeito da terapia fotodinâmica, assim como ilustrado na **Figura 1**. Importante ressaltar que ambas as reações do tipo 1 e 2 ocorrem de forma simultânea e a diferença entre elas vai depender de fatores como concentração de oxigênio molecular e de substrato presente, além do tipo de FS. O fato de o oxigênio singleto ter dominância na TFD faz com que trabalhos publicados apontem a reação de tipo 2 como a principal causadora da morte celular (LUCKY; SOO; ZHANG, 2015).

**Figura 1** - Mecanismo de ação da reação fotodinâmica.

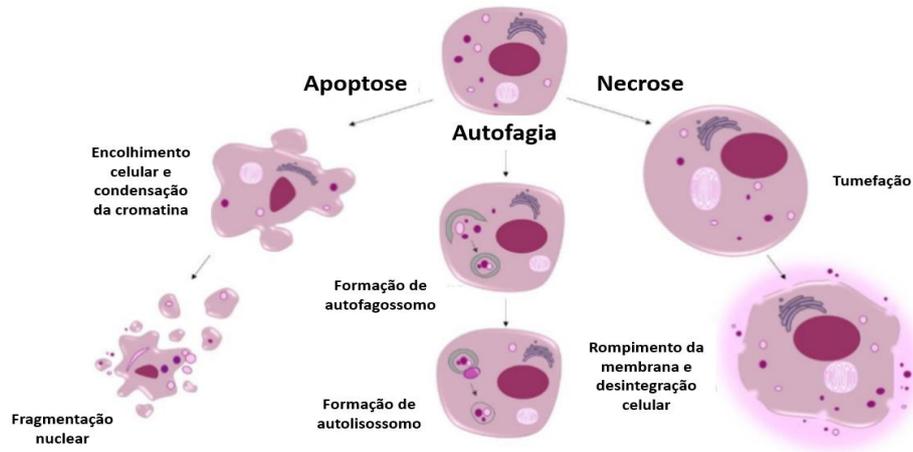


Fonte: adaptado de LUCKY *et al.*, 2015.

Em células de mamíferos, um mesmo FS pode, a depender do tipo de tratamento, ativar os mecanismos de morte celular mais estudados na TFD que são a necrose, apoptose e autofagia. Quando a TFD causa um fotodano pequeno, normalmente é ativado o mecanismo de autofagia, enquanto que um fotodano moderado ativa o mecanismo de apoptose e um fotodano alto induz a necrose (**Figura 2**). A apoptose é um mecanismo complexo, pois é ativada por duas vias: intrínseca e extrínseca. A via intrínseca é ativada quando há perturbação dentro ou fora da célula e é regulada pela BCL-2, uma família de proteínas anti e pró-apoptóticas como a BCL-2 (Linfoma de células B 2, do inglês *B-cell lymphoma 2*) e BAX (proteína X associada ao BCL-2, do inglês *Bcl-2 Associated X-protein*), respectivamente. Enquanto isso, a via extrínseca é ativada por perturbações no ambiente que são percebidas pela célula. Ambas as vias resultam na ativação das caspases 3 e 7 que causam a morte da célula. A autofagia é um processo catabólico que pode agir como mecanismo pró-sobrevivência ou de morte. Em ambos os casos, vai ocorrer a formação de um autofagossomo com membrana de duas camadas, e esse autofagossomo vai se fundir com lisossomos, causando a digestão da membrana interna do autofagossomo e vai formar o autolisossomo que é onde acontece a autofagia de fato. A formação do autolisossomo é importante tanto para a retirada de material danificado, quanto para a reutilização de nutrientes para serem utilizados nos processos celulares. A autofagia é regulada por diversas proteínas como o complexo de quinase 1 de ativação de autofagia semelhante a unc-51 (ULK1). Já a necrose é acompanhada de um aumento na permeabilidade celular que resulta em aumento do influxo de água e íons, causando um inchaço nas organelas e na própria célula, fazendo com que haja a formação de bolhas no citoplasma e aglomeração da cromatina. Diferentemente das

outras formas de morte celular, a necrose não necessita de síntese proteica ou cascatas de sinalização, o que a torna um processo passivo (DONOHOE *et al.*, 2019).

**Figura 2** - Características da apoptose, autofagia e necrose em uma célula qualquer.



Fonte: adaptado de DONOHOE *et al.*, 2019.

## 2.1.2 Componentes

### 2.1.2.1 Fonte de luz

Uma vez que o FS necessita da interação com a luz para que o mesmo a absorva e seja excitado, as características da fonte de luz tornam-se interessantes, pois o comprimento de onda da luz precisa estar na faixa de absorção do FS para que ocorra a devida absorção e excitação (KIM; DARAFSHEH, 2020).

A TFD utiliza de fontes de luz pertencentes a três grupos: lâmpadas de diodo (do inglês *light-emitting diode* - LED), lâmpadas de amplo espectro e os lasers. As lâmpadas halógenas, LED e luz intensa pulsada (LIP) fazem parte do grupo de fontes de luz não coerentes. A efetividade da TFD é apontada como estando presente em reações que penetrem de 1 a 3 mm na célula-alvo quando utilizada uma onda na faixa de 635 nm (ISSA; MANELA-AZULAY., 2010).

À escolha da fonte de luz deve ser dada a devida importância, pois é imprescindível que a fonte de luz utilizada seja capaz de promover transições eletrônicas no FS, além de serem levados em consideração aspectos como características teciduais, tamanho das lesões e a localização das mesmas (DOBSON; QUEIROZ; GOLDING, 2017). Na TFD o AM pode ser irradiado por diferentes fontes

de luz como LED, ultravioleta, laser e infravermelho (SONG *et al.*, 2011; JAVALI *et al.*, 2019).

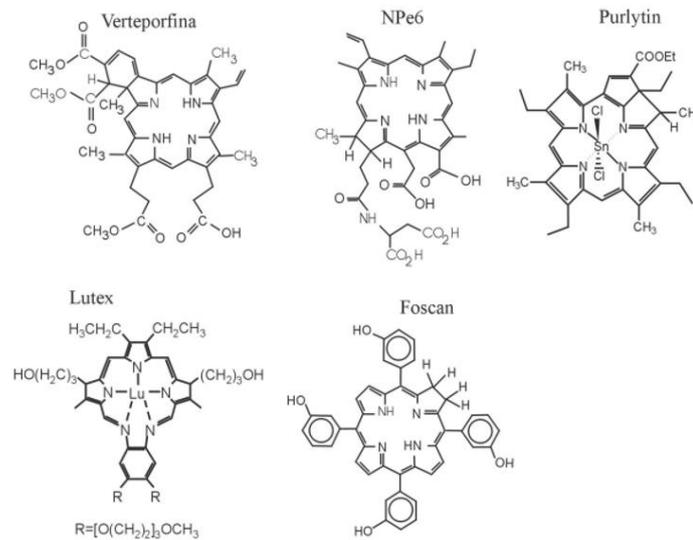
#### 2.1.2.2 Oxigênio

A TFD produz, em predominância, um agente citotóxico chamado oxigênio singlete que é altamente reativo. A reatividade do oxigênio singlete faz com que o mesmo tenha, na presença de solventes orgânicos, um tempo de meia-vida que vai de 10 a 100 ms. Enquanto isso, o oxigênio singlete na presença de um ambiente aquoso possui um tempo de meia-vida perto de 2 ms pelo fato de a energia da ligação oxigênio-hidrogênio (O-H) presente na molécula de água ser quase igual a energia do estado excitado do oxigênio singlete. A alta reatividade do oxigênio singlete e, por consequência, seu tempo de meia-vida muito curto, faz com que a TFD induza danos oxidativos em localidades com diâmetros aproximadamente iguais aos da espessura de membranas celulares como o DNA, mitocôndria, lisossomo, aparelho de Golgi e a própria bicamada lipídica da célula-alvo (MACDONALD; DOUGHERTY, 2000). A TFD produz outras EROS que também possuem importância na morte celular como peróxido de hidrogênio, radicais hidroxila e superóxido (LUCKY; SOO; ZHANG, 2015). A importância do oxigênio para a TFD também se apoia no fato de que, quando o oxigênio está diminuído, a eficácia da TFD é bastante reduzida. Além disso, também foi visto que células com menos de 5% de oxigenação (células hipóxicas) eram resistentes à TFD (MACDONALD; DOUGHERTY, 2000; WANG *et al.*, 2020).

#### 2.1.2.3 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador também é um componente de grande importância na TFD, interagindo com um comprimento de onda específico proveniente de uma fonte de luz e pode ser administrado de forma local ou sistêmica. A quantidade de fotossensibilizadores utilizados na TFD é diversa, sendo eles classificados de acordo com sua origem e estrutura química, são eles: corantes de fenotiazina (ex.: azul de metileno); monoterpenos (ex.: azuleno) e outros como porfirinas e clorinas (ex.: Foscan - temoporfina e clorina e6) como mostrado na **Figura 3** (PRAZMO *et al.*, 2016).

**Figura 3** - Estrutura química dos fotossensibilizadores.



Fonte: adaptado de PRAZMO *et al.*, 2016.

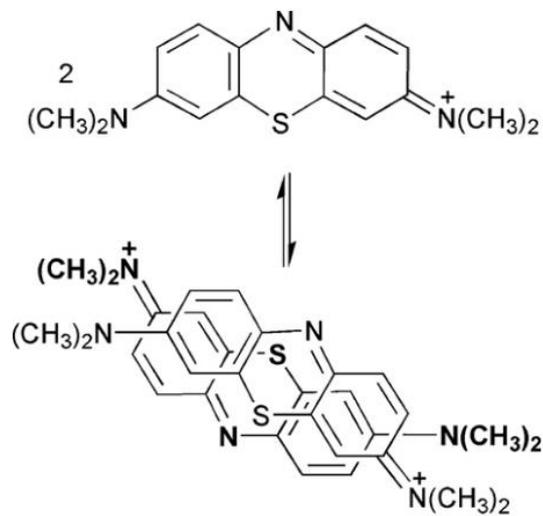
Para um FS ser considerado ideal para TFD é necessário que o mesmo possua algumas características como pureza química, eliminação rápida em tecidos normais, rendimentos quânticos altos para a geração de EROS e ativação por meio de comprimentos de onda com boa penetração nos tecidos (KALKA; MERK; MUKHTAR, 2000).

O AM é uma substância utilizada há muito tempo como corante histológico, tendo sua coloração dada pela banda de absorção que vai da região de 550 a 700 nm. Ainda o AM também pode ser utilizado na TFD contra bactérias e células tumorais (TARDIVO *et al.*, 2005; TURCHIELLO *et al.*, 2021).

O AM é considerado um FS à base de fenotiazina devido à sua estrutura composta por dois anéis benzênicos ligados por um átomo de nitrogênio e um de enxofre (**Figura 4**). Essas moléculas são catiônicas e os anéis aromáticos possuem uma conformação tricíclica planar, fazendo com que a estrutura formada componha um sistema que funciona como cromóforo (HARRIS *et al.*, 2004; CECATTO *et al.*, 2020). Outra característica que faz o AM ser um bom FS é o fato de possuir, à 664 nm, absorvidade molar máxima de  $85 \times 10^3$  M/cm, além de ter alto rendimento quântico de geração de oxigênio singleto ( $\phi \sim 0.5$ ) (SEVERINO *et al.*, 2003; TARDIVO *et al.*, 2005; ZHENG *et al.*, 2018). O AM é capaz de se agregar na forma de dímeros e isso faz com que o espectro de absorção seja dependente da concentração de AM

com uma constante de dimerização em água. A formação desses dímeros tem a capacidade de diminuir a absorção de luz, diminuindo sua eficiência na terapia fotodinâmica. Os dímeros do AM apresentam um espectro de absorção máxima diferente dos monômeros, sendo 664 nm para os monômeros e 590 para os dímeros. Esse espectro é importante no momento de calcular a porcentagem de cada espécie presente em uma determinada solução, servindo para reduzir a quantidade indesejada de dímeros na TFD (TURCHIELLO *et al.*, 2021).

**Figura 4** - Estrutura molecular do azul de metileno e do seu dímero.



Fonte: TAFULO; QUEIRÓS; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2009.

É sabido que o AM possui a tendência de se acumular na mitocôndria, uma vez que sua estrutura catiônica é atraída pelo potencial eletroquímico negativo da mesma (KANDELA; BARTLETT; INDIG, 2002). Além da mitocôndria, o anel benzênico presente na estrutura do AM faz com que ele atravesse a membrana plasmática da célula e se acumule em estruturas como lisossomos e fita dupla de DNA (YU *et al.*, 2014).

O AM pode ter seu desempenho melhorado quando associado com nanomateriais, tais como as SPIONs. A interação entre o AM e as SPIONs pode acontecer por meio da adsorção, fenômeno que consiste no acúmulo de determinada substância em uma superfície (GONÇALVES; FIGUEIREDO, 2020; SAMROT *et al.*, 2021). Adsorvato é o nome dado à substância que se acumula em uma superfície, enquanto que a superfície é chamada de adsorvente (NASCIMENTO *et al.*, 2014).

Antes de entrar em contato com o AM, o adsorvente possui diversos sítios de

adsorção disponíveis e isso é fundamental para que a adsorção aconteça, pois esse processo acontece quando as moléculas do corante vão ocupando os sítios de adsorção disponíveis. À medida que o tempo vai passando, os sítios de adsorção vão sendo ocupados até que não sobre sítios disponíveis para as moléculas de AM se ligarem e, nesse momento, a adsorção cessa, pois o sistema atingiu o estado de equilíbrio (WO *et al.*, 2019). Um exemplo da aplicação do AM associado a SPIONs na TFD é o estudo feito por Toledo *et al.*, em que SPIONs revestidas por sílica e associadas com o AM foram utilizadas para eliminar com sucesso bactérias da espécie *Escherichia coli* por meio do tratamento fotodinâmico (TOLEDO *et al.*, 2020).

## 2.2 NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS

As SPIONs são materiais nanoscópicos que podem ser influenciadas por um campo magnético externo, podendo ser manipuladas e, com isso, sendo utilizadas de múltiplas formas como na ressonância magnética, separação de biomoléculas, entrega direcionada de genes e drogas, além do desenvolvimento de plataformas terapêuticas inovadoras (OH; PARK, 2010; JANKO *et al.*, 2019; SANTANA *et al.*, 2020). Diversos elementos químicos podem ser utilizados para a fabricação do núcleo magnético, incluindo o ferro, o níquel e o cobalto, além da magnetita de domínio único ou magnetita superparamagnética ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ), conhecidas como SPIONs com o núcleo variando de 10 a 100 nm de diâmetro (SAFARIK; SAFARÍKOVÁ, 2002; SHUBAYEV; PISANIC II; JIN, 2009; WAHAJUDDIN; ARORA, 2012).

As NPs funcionam com o desempenho adequado quando geralmente estão com um tamanho em torno de 10 a 20 nm, uma vez que o tamanho e a forma podem influenciar nas propriedades do material. Associada com o tamanho, a chamada temperatura de bloqueio ( $T_b$ ) também é importante para o bom funcionamento das SPIONs, pois quando estão acima dessa temperatura as SPIONs adquirem um comportamento superparamagnético, uma vez que cada partícula comporta-se como tendo apenas um único domínio magnético (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007). O domínio magnético é uma região de magnetização uniforme e cada domínio é separado de outro pelas chamadas regiões de transição ou paredes de domínio. Nessas regiões de transição a direção de magnetização é mudada de um domínio para outro (DICKSON; FRANKEL, 1992).

O estado superparamagnético acontece em nanopartículas ferromagnéticas e

ferrimagnéticas pequenas. Quando essas nanopartículas são pequenas o suficiente, a direção da magnetização delas pode mudar de forma aleatória quando influenciada pela temperatura. Nesse contexto, surge o termo tempo de relaxamento de Néel que é o tempo entre duas mudanças de direção das nanopartículas. Assim, as nanopartículas adquirem um estado superparamagnético quando o tempo de magnetização das nanopartículas é maior do que o de relaxamento de Néel (ENRIQUEZ-NAVAS; GARCIA-MARTIN, 2012).

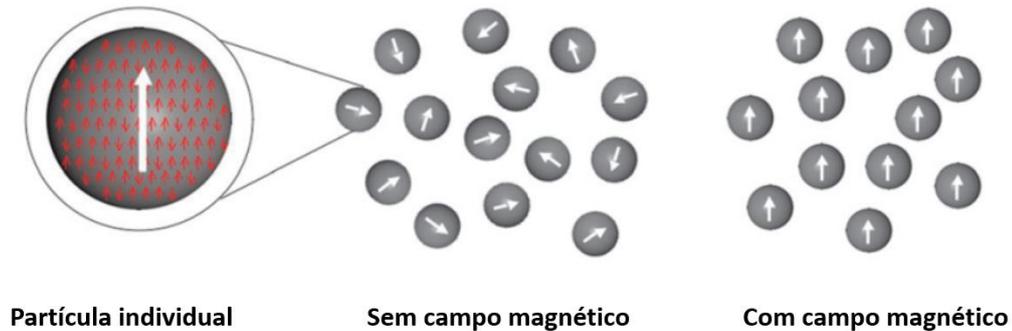
A  $T_b$  é definida por algumas variáveis como o tamanho das partículas, e o campo magnético que é aplicado, assim como a constante anisotrópica efetiva e o tempo de medição do experimento. Há uma forma de mensurar a temperatura de bloqueio que é resfriando a amostra de temperatura ambiente para campo magnético zero (ZFC). Após isso, um campo magnético é aplicado (aproximadamente 100 Oe) e a magnetização é observada por meio do aquecimento gerado. A partir disso, à medida que a temperatura aumenta, a energia causa uma perturbação no sistema, o que faz com que haja mais momentos adquirindo energia para se alinhar em direção ao campo magnético externo. Quando a quantidade de momentos alinhados (desbloqueados) atinge o máximo, a temperatura de bloqueio é alcançada, uma vez que acima da mesma a energia térmica gerada é forte o bastante para diminuir a magnetização por meio da randomização dos momentos magnéticos. Uma vez que o tamanho das partículas é uma das variáveis que afetam a temperatura de bloqueio, se houver uma distribuição ampla do tamanho dessas partículas haverá, por consequência, uma grande amplitude de temperaturas de bloqueio, o que acaba não sendo ideal (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

Existem algumas características que fazem com que as nanopartículas superparamagnéticas chamem atenção para aplicação na saúde, são elas: ter um constante e forte momento magnético; e agir como um grande átomo paramagnético, onde apresenta coercitividade, além de apresentar uma resposta ágil diante de um campo magnético externo com remanência magnética irrisória (magnetismo residual) (LU; SALABAS; SCHÜTH, 2007).

A influência da temperatura faz com que as SPIONs apresentem o momento magnético de cada nanopartícula girando de forma aleatória de acordo com a orientação das nanopartículas magnéticas. Então, na presença de temperaturas altas o suficiente (ex.: 858°K para as SPIONs de  $Fe_3O_4$ ) e na ausência de um campo magnético, o sistema que contém as nanopartículas magnéticas vai apresentar um

momento magnético de zero. Em contrapartida, quando há a presença de um campo magnético, o sistema contendo as SPIONs vai apresentar um alinhamento dos momentos magnéticos (**Figura 5**) (COLOMBO *et al.*, 2012; NINGTHOUJAM, 2017).

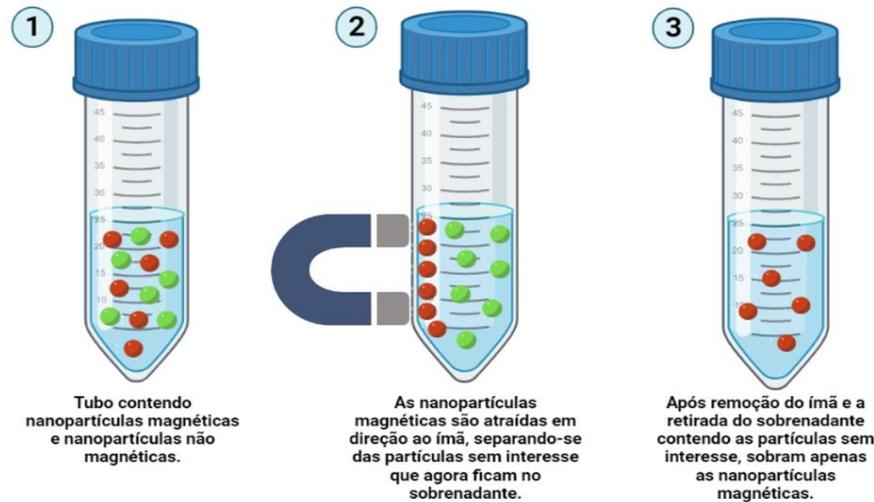
**Figura 5** - Representação esquemática de uma nanopartícula superparamagnética.



Fonte: adaptada de COLOMBO *et al.*, 2012.

As NPs superparamagnéticas apresentam uma susceptibilidade magnética bem maior em relação às partículas paramagnéticas. Geralmente, um material ferromagnético transita para o estado paramagnético, isto é, estado onde o material só apresenta magnetização na presença de um campo magnético externo quando está acima de sua temperatura de Curie ( $T_c$ ). Enquanto isso, o estado superparamagnético é atingido quando o material está abaixo da  $T_c$  (MARGHUSSIAN, 2015). A  $T_c$ , também chamada de ponto de Curie, é atingida quando um material é aquecido e, fazendo com que o mesmo perca seu magnetismo permanente. Quando um material está abaixo da  $T_c$ , os domínios magnéticos estão alinhados a um ponto onde mesmo um campo magnético externo fraco é capaz de causar magnetização, enquanto à medida que a temperatura aumenta, atingindo a  $T_c$  ou mesmo passando por esse ponto, a energia térmica gerada é aumentada e isso provoca uma quebra no alinhamento dos momentos magnéticos, fazendo com que o material se torne paramagnético (PASQUALE, 2020). A separação magnética das SPIONs pode ser feita de forma simples, aplicando um campo magnético externo (ímã) na parede de um tubo para causar agrupamento das partículas na parede e, depois, retira-se o sobrenadante resultante da agregação (**Figura 6**) (PANKHURST *et al.*, 2003).

**Figura 6** - Processo de separação magnética, onde o ímã é aplicado na parede do tubo contendo uma solução com nanopartículas magnéticas (bolas vermelhas). Após a separação pelo ímã, o sobrenadante contendo partículas não magnéticas (bolas verdes) é retirado da solução.



Fonte: o autor, 2022.

### 2.3 FUNCIONALIZAÇÃO DAS SPIONS

As SPIONs são observadas com amplo interesse em aplicações na área da saúde por suas características como biocompatibilidade, propriedades magnéticas melhoradas e a capacidade de modificação de sua superfície, as quais são responsáveis pelas SPIONs serem conduzidas e acumuladas nos tecidos-alvo. Sendo assim, em virtude de aprimorar a estabilidade coloidal e a biodistribuição, as SPIONs são frequentemente funcionalizadas com polímeros ou moléculas biocompatíveis, sejam estes obtidos de forma natural como os polissacarídeos (dextrano, alginato), ou ainda obtidos de forma sintética como o policaprolactona (PCL), (poli(lactídeo-co-glicólico) (PLGA) e o polietilenoglicol (PEG). O PEG, por exemplo, aumenta o tempo de circulação sistêmica das SPIONs, uma vez que o mesmo reduz o reconhecimento de macrófagos e a ligação a proteínas plasmáticas (PIAZZA *et al.*, 2020).

Um dos polímeros que podem ser utilizados para modificar a superfície das SPIONs é o PSSS. Segundo Qi Hwa Ng *et al.*, o PSSS pode ser dissolvido em água deionizada e colocado em banho ultrassônico para uma boa homogeneização. Seguindo esse procedimento, a suspensão de  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  também é preparada em água deionizada e ultrassonicada para que haja quebra de possíveis agregados. Após isso, a solução de PSSS é adicionada à suspensão magnética, colocada em banho ultrassônico e depois em um agitador durante 24 horas para que haja interação entre

o PSSS e as SPIONs via atração eletrostática. Ainda, o sistema SPIONs-PSSS é colocado em contato com um campo magnético externo (ímã) para que o excesso de PSSS que não interagiu com as nanopartículas possa ser separado e descartado por meio de lavagens. Ao final das lavagens, o sistema SPIONs-PSSS é ressuspenso em água deionizada (NG *et al.*, 2014).

A utilização do PSSS como agente estabilizante, ou seja, polímero de revestimento, é possibilitada, uma vez que as macromoléculas do PSSS se ligam à superfície das SPIONs como o óxido de ferro ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) por meio de ligação de hidrogênio entre a região do PSSS constituída por enxofre (S) e oxigênio e o óxido de ferro das SPIONs ( $\text{S}=\text{O}\cdots\text{H}-\text{O}-\text{Fe}$ ) (YEAP *et al.*, 2014). Essa ligação de hidrogênio promove uma funcionalização que resulta em estabilidade coloidal para o sistema, uma vez que as cargas negativas do PSSS provocam estabilidade eletrostática, pois são capazes de superar as forças de Van der Waals e a atração magnética dipolo-dipolo das SPIONs (YEAP *et al.*, 2014).

#### 2.4 POLI (4-ESTIRENO SULFONATO DE SÓDIO)

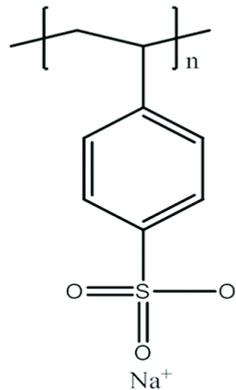
Além da função de funcionalizante e estabilizante, o PSSS também pode ser considerado um fármaco, visto que recebeu a aprovação da Administração de Alimentos e Medicamentos (do inglês *Food and Drug Administration - FDA*) e é comercializado sob o nome de Kayexalate, sendo administrado de forma oral para o tratamento de hipercalemia, uma vez que esse sal é um ligante de potássio. De acordo com um estudo realizado por Pawel Botwina *et al.*, o PSSS apresenta potencial para combater o Zika vírus (ZIKV), se ligando de forma direta a esse vírus e impedindo que o ZIKV se ligue e infecte as células hospedeiras, inibindo assim a sua replicação (BOTWINA *et al.*, 2020).

O PSSS é um polieletrólito que faz trocas catiônicas e é muito utilizado para revestir materiais de forma que fiquem mecanicamente estáveis e reprodutíveis (CHEN *et al.*, 2017). Uma outra forma de ligação das SPIONs ao PSSS é apresentada por Williams *et al.*, em que os grupos sulfonados presentes na estrutura química do PSSS (**Figura 7**) se ligaram aos íons de ferro das SPIONs presentes na solução (WILLIAMS *et al.*, 2016). Chenghan Ji *et al.* mostraram que os grupos sulfonados do PSSS oferecem sítios de adsorção para o óxido de níquel ( $\text{Ni}^{2+}$ ), fazendo com que esse íon carregado positivamente seja ligado ao PSSS por meio de atração

eletrostática, configurando, assim, uma outra possibilidade de ligação do PSSS com diferentes estruturas (JI *et al.*, 2021). Um exemplo de utilização do PSSS com as SPIONs é descrito por Williams *et al.*, em que a funcionalização das SPIONs com o PSSS acontece a fim de produzir um nanocomposto capaz de ser utilizado como contraste na ressonância magnética (WILLIAMS *et al.*, 2016).

Além de apresentar baixo custo e toxicidade, o PSSS é dissolvido facilmente em água quando em contato com a temperatura ambiente e possui compatibilidade satisfatória com diversas técnicas de processamento de material biológico, uma vez que o PSSS é insolúvel em diversos solventes orgânicos como o clorofórmio, tolueno e acetona (JI *et al.*, 2015).

**Figura 7** - Estrutura química do poli (4-estireno sulfonato de sódio).



Fonte: JI *et al.*, 2015.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver uma nanoplataforma baseada em azul de metileno conjugado às SPIONs funcionalizadas com PSSS (SPIONs-PSSS-AM) com potencial terapêutico na TFD.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Sintetizar as SPIONs em fase aquosa;
- Funcionalizar as SPIONs com o PSSS;
- Avaliar o processo de modificação de superfície das SPIONs com o PSSS;
- Conjuguar o azul de metileno na matriz SPIONs-PSSS;
- Otimizar o processo de conjugação do azul de metileno na matriz SPIONs-PSSS;
- Caracterizar a nanoplataforma produzida (SPIONs-PSSS-AM) com potencial terapêutico na TFD.

## 4. METODOLOGIA

### 4.1 SÍNTESE DAS SPIONS

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, isto é, as SPIONS, com diâmetro aproximadamente de 15 nm, foram obtidas em fase aquosa seguindo o protocolo descrito por Cabrera *et al.* (2017). As SPIONS foram sintetizadas pelo método de coprecipitação alcalina a partir de sais de  $\text{Fe}^{2+}$  e  $\text{Fe}^{3+}$ . Primeiramente, foram dissolvidos  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  e  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  com proporção molar de 2:3 em uma solução aquosa de HCl (2M) e depois submetidos à agitação sob temperatura ambiente. À solução aquosa contendo os íons de ferro, sob agitação vigorosa, foram acrescentados 50 mL de hidróxido de amônio (7M). Após isso, a suspensão magnética foi submetida a aquecimento a 50 °C em banho ultrassônico durante 30 minutos e, depois de ser resfriada à temperatura ambiente, as SPIONS foram lavadas com água ultra pura até atingir pH próximo do neutro. Para o processo de lavagem foi utilizado um ímã super forte de neodímio.

### 4.2 PREPARAÇÃO DAS SPIONS COM PSSS

O PSSS foi obtido comercialmente da empresa Sigma-Aldrich com peso molecular de aproximadamente 70.000,00 Da. Para o processo de funcionalização/modificação de superfície das SPIONS com o PSSS foi realizado um planejamento de experimentos com o objetivo de investigar os principais fatores que poderiam influenciar na preparação do material SPIONS-PSSS.

O estudo quimiométrico consistiu na realização de um planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$ , com um total de 4 ensaios experimentais e, investigando os fatores: o volume de SPIONS, a concentração de PSSS e o tempo de contato do PSSS com as SPIONS. A **Tabela 1** mostra os níveis (mínimo e máximo) de cada variável independente investigada.

**Tabela 1.** Variáveis e níveis de experimentos para o planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$ 

Variáveis	Código	Níveis	
		(-)	(+)
Fator de diluição das SPIONs	X <sub>1</sub>	1/20	1/40
Concentração de PSSS (%)	X <sub>2</sub>	0,5	1,0
Tempo de contato PSSS (h)	X <sub>3</sub>	2	16

A **Tabela 2** mostra o conjunto de combinações possíveis no planejamento fatorial fracionário citado. Medidas de potencial zeta foram utilizadas como a variável dependente (resposta), uma vez que essa técnica fornece informações sobre o processo de modificação de superfície. Ressalta-se que, devido à pequena quantidade de experimentos a serem realizados, não foi necessário a realização dos experimentos em ordem aleatória. Sendo assim, todos os quatro experimentos foram realizados no mesmo dia.

**Tabela 2.** Matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$ 

Nº Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>
1	-1	-1	1
2	1	-1	-1
3	-1	1	-1
4	1	1	1

Para a realização dos experimentos inicialmente foi necessário diluir as SPIONs em água milli-Q. As soluções de PSSS foram preparadas em tampão PBS (pH 7,2). As amostras magnéticas contendo o PSSS foram colocadas sob agitação à temperatura ambiente e ao resguardo da luz. Após o tempo de contato necessário as SPIONs foram lavadas 5 vezes com água milli-Q e armazenadas a 4°C até posterior utilização.

No processo de preparação do material SPIONs-PSSS foi utilizada uma balança analítica de modelo AUY220 da empresa Shimadzu, um banho ultrassônico de modelo UltraCleaner 1400A da empresa Unique para auxiliar na dispersão das

nanopartículas e, também, um homogeneizador de tubos modelo Bio RS-24 da empresa BioSan.

As medidas de potencial zeta foram realizadas utilizando o equipamento NanoZS da empresa Malvern. Para as análises, as amostras magnéticas foram diluídas em água milli-Q (pH ~6) e mantidas à temperatura ambiente.

### 4.3 CONJUGAÇÃO DO AM COM AS SPIONS-PSSS

Antes de iniciar com o processo de conjugação, o sistema SPIONs-PSSS teve a verificação da preservação da sua propriedade magnética, uma vez que o material ficou armazenado a 4°C por cerca de 1 mês.

A interação do AM com o sistema SPIONs-PSSS aconteceu por adsorção, onde a carga positiva do corante interagiu com a carga negativa do material magnético. Inicialmente, os ensaios de conjugação consistiram na combinação de 2 partes volumétricas das SPIONs-PSSS com 1 parte volumétrica de AM. Foi preparada uma solução mãe (estoque) de AM 10 mmol.L<sup>-1</sup> em PBS (pH 7,2). A partir desta solução mãe, foi preciso preparar uma segunda solução na concentração de 0,135 mmol.L<sup>-1</sup> em PBS (pH 7,2). Esta solução foi empregada para adicionar ao sistema SPIONs-PSSS. A **Tabela 3** mostra as condições experimentais para a conjugação do AM com o material magnético. Ressalta-se que em todas as amostras preparadas, a concentração final do AM foi de 45 µmol.L<sup>-1</sup>.

Uma vez que o AM é fotossensível, os frascos e tubos contendo o AM foram revestidos com papel de alumínio durante a manipulação dos mesmos e isso aconteceu no decorrer de todos os experimentos.

**Tabela 3.** Condições experimentais no processo de conjugação do AM com as SPIONs-PSSS.

Ensaio	Fd SPIONs-PSSS	[AM] <sub>f</sub> (µmol.L <sup>-1</sup> )	Tempo de contato* (h)
A1	1/5	45,0	2
A2	1/10	45,0	2

\*Sob agitação magnética

Após o tempo de contato de 2h do AM, os sistemas foram retirados da agitação e armazenados a 4°C (Zhu *et al.* (2015)). As alíquotas do sobrenadante foram retiradas

2 dias depois para investigar o sucesso do processo de conjugação. A separação das alíquotas (sobrenadante) consistia em prender os tubos, contendo SPIONs-PSSS-AM mais AM livre, em um ímã super forte (neodímio) durante 2 minutos. Após a separação das SPIONs-PSSS-AM, o sobrenadante foi retirado e guardado e armazenado a 4°C para posterior análise de espectroscopia de absorção no UV-Vis. As medidas de absorbância na região do visível foram realizadas em um espectrofotômetro UV-Vis modelo UV-1800 da marca Shimadzu.

Com o intuito de investigar melhor as condições de conjugação do AM, quantidades diferentes do material SPIONs-PSSS, assim como o tempo de contato foram investigadas. Ressalta-se que a proporção volumétrica entre os 2 ensaios apresentados na **Tabela 4** foi também diferente. Assim, o ensaio A3 manteve a combinação de 2 partes volumétricas das SPIONs-PSSS com 1 parte volumétrica de AM na concentração de 0,135 mmol.L<sup>-1</sup> em PBS (pH 7,2) e o ensaio A4 teve a combinação de 5 partes volumétricas das SPIONs-PSSS com 1 parte volumétrica de AM na concentração de 0,270 mmol.L<sup>-1</sup> em PBS (pH 7,2). A separação do sobrenadante, bem como a análise do mesmo por medidas de espectroscopia no UV-Vis foram realizadas conforme já foi detalhado anteriormente. A **Tabela 4** mostra as outras condições experimentais estudadas no processo de conjugação do AM no sistema SPIONs-PSSS.

**Tabela 4.** Condições experimentais no processo de conjugação do AM com as SPIONs-PSSS.

Ensaio	SPIONs-PSSS	[AM] <sub>f</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> )	Tempo de contato* (h)
A3	concentrado	45,0	16
A4	concentrado	45,0	16

\*Sob agitação magnética

#### 4.4 OTIMIZAÇÃO DO SISTEMA SPIONs-PSSS-AM

Considerando os resultados obtidos e com o objetivo de aprimorar a preparação de uma nanoplataforma mais eficaz para a captação de AM, foram

realizadas as modificações em: (i) processo de modificação das SPIONs com o PSSS, e (ii) processo de conjugação do AM com SPIONs-PSSS.

A preparação das SPIONs com PSSS seguiu conforme protocolo descrito na seção 4.2, com as modificações detalhadas na **Tabela 5**. Ainda, para a realização dos experimentos tanto as SPIONs, bem como o PSSS foram preparadas em água milli-Q. Após os 30 minutos, os sistemas P1 e P2 foram lavados 3 vezes utilizando água milli-Q e com o auxílio de centrífuga a 5000 rpm durante 3 minutos. Terminadas as lavagens os sistemas foram ressuspensos em água mili-Q e armazenados a 4°C até posterior uso.

**Tabela 5.** Processo de modificação de superfície das SPIONs com AM.

Ensaio	SPIONs-PSSS	[PSSS] (%)	Temperatura (°C)	Tempo de contato* (min)
P1	1/20	0,5	60	30
P2	1/20	1,5	60	30

\*Sob agitação magnética

As medidas de potencial zeta foram realizadas nas amostras P para avaliar a carga superficial do material produzido. O procedimento utilizado para o preparo das amostras foi o mesmo citado na seção 4.2.

Seguindo os experimentos com as amostras P, para a conjugação do AM com as SPIONs-PSSS foram realizados 4 ensaios conforme detalhamentos que podem ser encontrados na **Tabela 6**.

**Tabela 6.** Condições experimentais no processo de otimização da conjugação do AM com as SPIONs-PSSS.

Ensaio	Proporção volumétrica (Mag:AM)* <sup>1</sup>	SPIONs-PSSS	[AM] <sub>0</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> )	[AM] <sub>f</sub> (μmol.L <sup>-1</sup> )	Tempo de contato* <sup>2</sup> (h)
A5	2:1	P1	135,0	45,0	16
A6	5:1	P1	270,0	45,0	16
A7	2:1	P2	135,0	45,0	16
A8	5:1	P2	270,0	45,0	16

\*<sup>1</sup>Mag representa SPIONs-PSSS; \*<sup>2</sup>Sob agitação magnética

Após as 16 h sob agitação, à temperatura ambiente e ao resguardo da luz, as amostras foram armazenadas a 4°C. O sobrenadante das amostras A5 e A6 foi recolhido com 3 dias após a preparação, enquanto que o das amostras A7 e A8 após 10 dias. Esta diferença permitiu-nos avaliar o efeito do tempo no processo de conjugação do AM. Ressalta-se que antes de realizar as medidas no espectrofotômetro UV-Vis, todas as amostras foram centrifugadas por 3 minutos a 6000 rpm a 25°C para evitar que possíveis nanopartículas interferissem na análise.

Com o intuito de conhecer a quantidade de AM adsorvido no sistema SPIONs-PSSS, foi necessário quantificar o AM livre no sobrenadante. Assim, por diferença da quantidade ofertada de AM e o AM livre é possível conhecer a quantidade de AM conjugado à matriz magnética. Para isto, foi preparada uma curva de calibração de AM na faixa de 1-20 μmol.L<sup>-1</sup>.

#### 4.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS

Os sistemas com as características desejadas foram caracterizados por medidas de potencial zeta conforme já foi detalhado anteriormente. Medidas no infravermelho também foram realizadas em amostras no estado sólido. Para isto, uma alíquota da amostra teve todo o líquido retirado com auxílio de um ímã e, posteriormente colocado em estufa a 50-60°C até secagem completa.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 SÍNTESE DAS SPIONS

Uma vez que a preparação das SPIONS seguiu a metodologia proposta por Cabrera *et al.* (2017), a suspensão magnética obtida, em fase aquosa, foi reprodutível e apresentou as características citadas pelos autores. Dentre elas, a boa estabilidade coloidal como mostrada na **Figura 8**. O tamanho médio das nanopartículas próximos dos 15 nm, assim como a magnetita como fase dominante foram também observados no material resultante. A resposta magnética após aplicação de um campo magnético externo (ímã) foi satisfatória, acontecendo uma rápida separação em menos de 1 minuto.

**Figura 8** - Ferrofluido em fase aquosa.



Fonte: o autor, 2022.

### 5.2 PREPARAÇÃO DAS SPIONS COM PSSS

A **Tabela 7** mostra a matriz dos experimentos realizados no processo de preparação do sistema SPIONS-PSSS, assim como os resultados do potencial zeta das amostras obtidas no estudo quimiométrico. Observando o valor do potencial zeta das SPIONS sozinhas e das SPIONS após contato com o PSSS, é possível sugerir que o processo de modificação de superfície mostrou-se satisfatório para todas as amostras, isto é, houve uma diminuição do potencial zeta após tratamento com o PSSS. Esta análise foi também realizada para uma amostra de PSSS e o resultado evidenciou a carga mais negativa para o polímero. Uma vez que o PSSS apresentou uma carga bastante negativa, as SPIONS revestidas por esse polímero adquiriram

uma carga mais negativa do que haviam apresentado antes da funcionalização. Sendo assim, o experimento 1 foi o escolhido para a próxima etapa (conjugação do AM), uma que vez que apresentou uma pequena diferença favorável no potencial zeta (mais negativo) e os níveis mínimos para os dois primeiros fatores. Portanto, para a preparação do sistema SPIONs-PSSS foram utilizadas as condições experimentais: 20 o fator de diluição das SPIONs, 0,5% concentração de PSSS e 16h de tempo de contato (sob agitação magnética) entre as SPIONs e o PSSS.

**Tabela 7.** Matriz do planejamento fatorial fracionário  $2^{3-1}$  e valores de potencial zeta.

Nº Experimento	X <sub>1</sub>	X <sub>2</sub>	X <sub>3</sub>	Potencial zeta (mV)
1	-1	-1	1	-37,7
2	1	-1	-1	-35,7
3	-1	1	-1	-35,7
4	1	1	1	-33,0
SPIONs	-	-	-	-23,0 <sup>a</sup>
PSSS	-	-	-	-47,1 <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Segundo Cabrera *et al.* 2017

<sup>b</sup>Determinado pelo autor.

Segundo Lühe *et al.* (2015), as SPIONs formam dispersões estáveis quando funcionalizadas (LÜHE *et al.*, 2015; SILVEIRA; SILVA; MAGDALENA, 2021). Este comportamento pode ser atribuído às mudanças na carga de superfície das NPs (BERG *et al.*, 2009).

### 5.3 CONJUGAÇÃO DO AM COM AS SPIONS-PSSS

Após a preparação das amostras A1 e A2, conforme condições experimentais foram detalhadas na **Tabela 3**, os resultados obtidos não foram satisfatórios. Para avaliar se o processo de conjugação do AM foi efetivo, o sobrenadante foi analisado no espectrofotômetro UV-Vis. Os resultados (dados não apresentados) mostraram elevados valores de absorbância para o sobrenadante nos comprimentos de onda característicos para o AM.

Novos ensaios foram realizados com o intuito de promover uma conjugação do AM mais efetiva. Para isto, a concentração do sistema SPIONs-PSSS e o tempo de contato foram modificados (**Tabela 4**). As amostras A3 e A4 apresentaram resultados similares aos das amostras A1 e A2. Estes dados chamaram a atenção, uma vez que foi ofertada uma quantidade maior de sistema magnético e foi aumentado o tempo de contato entre o AM e o sistema SPIONs-PSSS. Dessa forma, os próximos experimentos contemplam variações no processo de modificação das SPIONs com o PSSS, assim como um tempo de contato maior entre o AM e as SPIONs-PSSS.

Dentre os experimentos de otimização, inicialmente, foi realizada uma variação na temperatura de preparação do sistema SPIONs-PSSS. Macroscopicamente a suspensão magnética obtida se mostrou com boa estabilidade coloidal e preservação da coloração marrom escuro. A resposta magnética foi também satisfatória, uma vez que em poucos segundos foi observada a separação do material após contato com o ímã.

Na técnica de potencial zeta, valores muito positivos ou muito negativos expressam uma força de repulsão grande entre as partículas presentes na solução. Então, partículas com cargas semelhantes causam uma repulsão suficiente a ponto de impedir que as partículas formem agregados e, conseqüentemente, permite uma certa facilidade na redistribuição delas (LUNARDI *et al.*, 2020). Segundo Clogston e Patri (2011), nanopartículas com um potencial zeta de -10 mV ou +10 mV podem ser consideradas neutras, enquanto as NPs que apresentam um potencial zeta menor que -30 mV são tidas como bastante aniônicas e NPs com um potencial zeta acima de +30 mV são fortemente catiônicas. Ainda segundo Samimi *et al.* (2019), os autores explanam que, para que uma nanodispersão tenha uma boa estabilidade coloidal é preciso que as NPs tenham um potencial zeta de -30 mV, valor que os autores consideram como adequado (SAMIMI *et al.*, 2019). Já de acordo com Cabrera e colaboradores, sistemas que apresentam um potencial zeta acima de 20 mV em módulo podem ser tidos como suspensões quimicamente estáveis (CABRERA *et al.*, 2017).

Enquanto isso, as amostras P1 e P2 apresentaram valores de potencial zeta de -38,2 mV e -37,5 mV, respectivamente. Uma vez que tais amostras haviam sido previamente revestidas pelo PSSS, é possível inferir que a carga negativa adquirida pelas SPIONs foi devido à adição do polímero, indicando que o processo de funcionalização/modificação de superfície ocorreu eficientemente. Um estudo

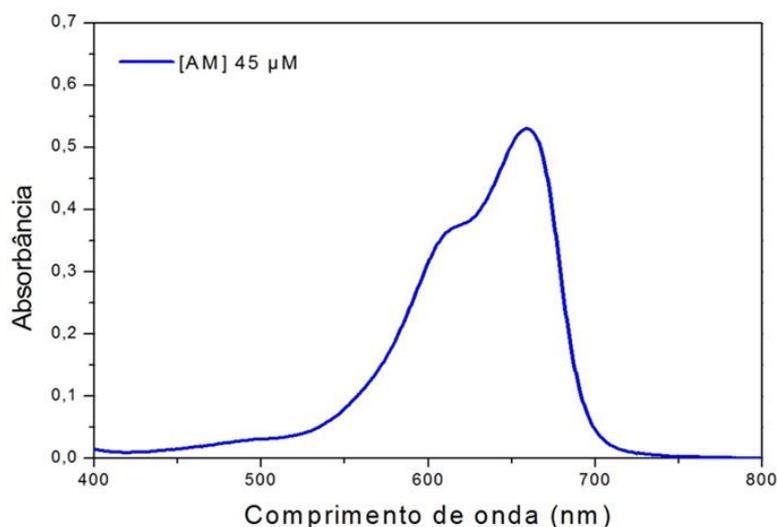
realizado por Zhang *et al.* (2014) demonstrou resultado similar, em que SPIONs isoladas tiveram o potencial zeta de +0,7 mV e, depois de revestidas pelo PSSS, o potencial zeta encontrado foi de -19,6 mV, indicando que a mudança de carga adquirida pelas nanopartículas magnéticas foi em decorrência da funcionalização por esse polímero (ZHANG *et al.*, 2014). Semelhantemente, um outro estudo demonstrou que as nanopartículas magnéticas apresentaram um potencial zeta de +38 mV em água, e quando revestidas por PSSS passaram a apresentar um potencial zeta de -18 mV indicando, mais uma vez, que o revestimento pelo PSSS é capaz de causar uma inversão do potencial zeta das SPIONs (NAKAMURA; KATAGIRI; KOUMOTO, 2010).

#### 5.4 AVALIAÇÃO ÓPTICA DOS SISTEMAS

A **Figura 9** mostra o espectro de absorbância encontrado para a concentração de  $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$  do AM do presente estudo em que foram observados dois picos, estando o maior na faixa de 660 nm e o menor em 615 nm. A concentração final de  $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$  de AM foi baseada no estudo realizado por Rodrigues *et al.* (2021), em que a equipe usou esta concentração de azul de metileno para o mesmo ser utilizado contra cepas de bactérias *Staphylococcus aureus* mediante tratamento fotodinâmico (RODRIGUES *et al.*, 2021). O AM apresenta uma boa produção de oxigênio singleto na janela terapêutica para a TFD que corresponde de 600 a 900 nm (FALES; YUAN; VO-DINH, 2011). A janela terapêutica é uma região que delimita dois extremos, isto é, comprimentos de onda menores que 600 nm são tidos como pouco penetrantes, enquanto comprimentos maiores que o da janela terapêutica não apresentam energia suficiente para excitar o oxigênio molecular em oxigênio singleto (CHILAKAMARTHI; GIRIBABU, 2017).

Sendo assim, o AM utilizado no presente estudo apresentou bandas de absorção condizentes com a janela terapêutica para a TFD, estando, assim, adequado para apresentar potencial terapêutico quando utilizada na TFD.

**Figura 9** - Espectro de absorção do AM na concentração de  $45 \mu\text{mol.L}^{-1}$ .

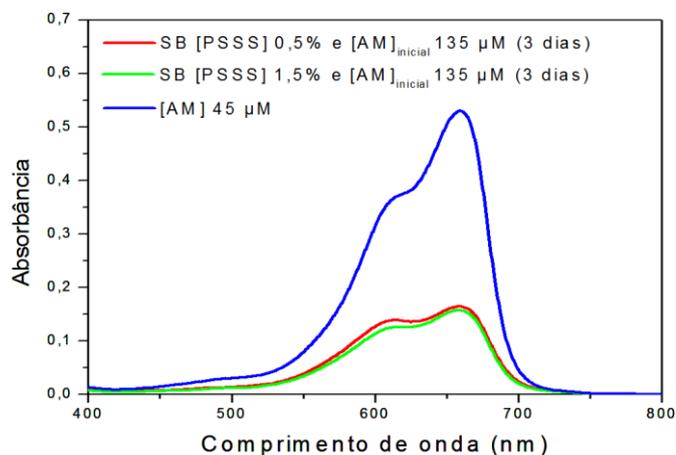


Fonte: o autor, 2022.

Conforme as informações descritas na **Tabela 6**, as amostras P1 e P2 foram utilizadas no processo de otimização da conjugação do AM com as SPIONs-PSSS. No total foram realizados 4 experimentos (A5-A8). Como mencionado anteriormente, após o tempo de contato do AM com o sistema magnético foi recolhido o sobrenadante e analisado por espectrofotometria UV-Vis. Dessa forma, por determinação quantitativa indireta é possível saber a quantidade de AM adsorvido no sistema SPIONs-PSSS.

A **Figura 10** mostra os espectros de absorbância obtidos para as amostras A5 (em vermelho) e A7 (em verde), em que se observa um perfil similar ao do AM, porém com valores de absorbância menor. Este resultado sugere que houve conjugação eficiente do AM na superfície do sistema SPIONs-PSSS. O perfil do espectro entre as amostras A5 e A7 foi bem parecido, havendo apenas uma pequena diferença para maiores valores de absorbância para a amostra A5. Uma vez que ambas as amostras possuem concentração inicial de AM de  $135 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e foram obtidas 3 dias após preparação dos ensaios, um outro critério de avaliação foi a concentração de PSSS utilizada na preparação. Com isso, é possível sugerir também que, nesses experimentos, ofertar uma concentração maior de PSSS não aprimorou o sistema, pois o espectro de absorção utilizando 0,5% de PSSS foi quase igual ao da amostra em que foi ofertado o triplo de PSSS (1,5%), ou seja, uma quantidade maior do polímero permitiu obter um resultado muito semelhante.

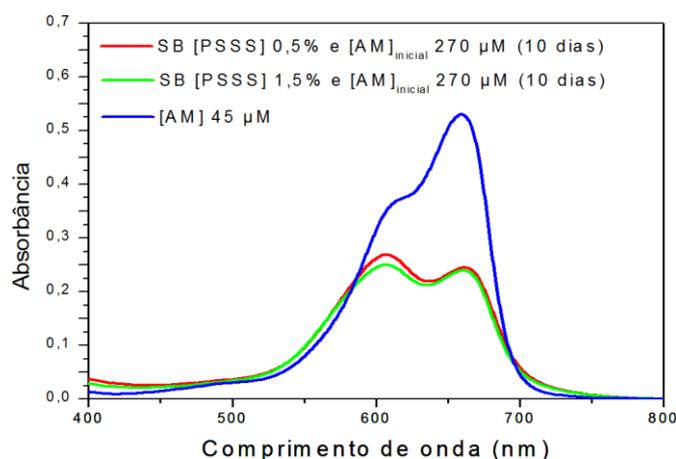
**Figura 10** - Espectros de absorção das amostras A5 (em vermelho), A7 (em verde) e AM (em azul).



Fonte: o autor, 2022.

Por outro lado, a **Figura 11** mostra os espectros de absorção referentes às amostras A6 (em vermelho) e A8 (em verde), em que é possível observar que a amostra A6 apresentou uma absorbância ligeiramente maior em relação à amostra A8. Porém, as duas amostras apresentaram valores de absorbâncias menores quando comparados com o AM. Este resultado sugere uma conjugação do AM no sistema magnético. Ainda, considerando que ambas as amostras foram preparadas utilizando uma concentração inicial de AM de  $270 \mu\text{mol.L}^{-1}$  e foram retiradas 10 dias após o preparo dos ensaios, um outro critério de avaliação foi a concentração de PSSS ofertada. Com isso, conclui-se que utilizar uma concentração menor de PSSS mostrou-se mais interessante, uma vez que os espectros de absorção de ambas as amostras A6 e A8 foram parecidos. Também é interessante notar que, o perfil do espectro dos sobrenadantes mostrados na **Figura 11** apresentam uma inversão dos picos de absorção devido à autoagregação do AM (formação de dímeros), comportamento característico quando se trabalha com concentrações maiores do corante orgânico.

**Figura 11** - Espectros de absorção das amostras A6 (em vermelho) e A8 (em verde) e AM (em azul).



Fonte: o autor, 2022.

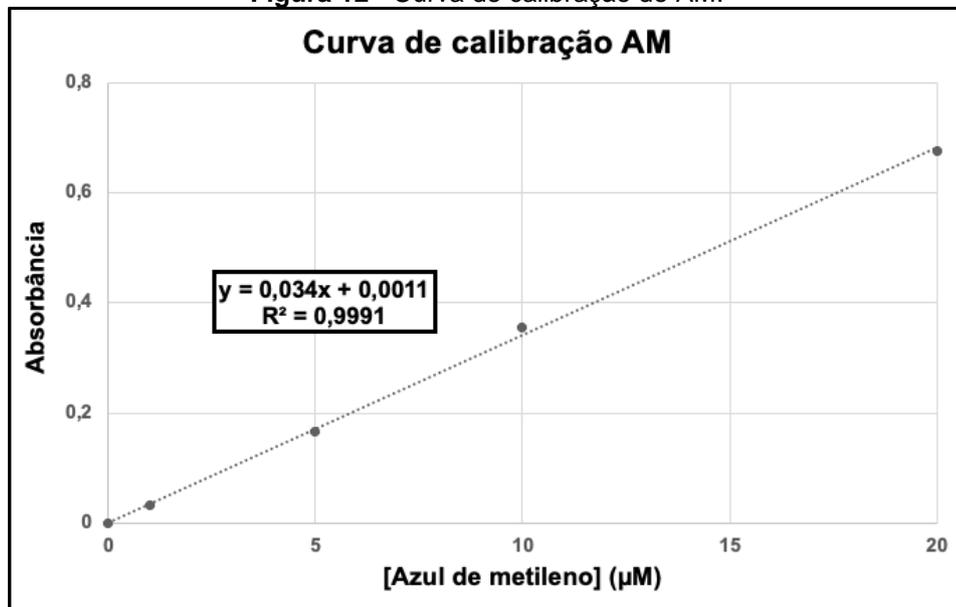
De acordo com Khadieva *et al.* (2021), quando moléculas catiônicas como o AM se agregam, isto é, formam dímeros, há uma mudança nas propriedades fotofísicas. Assim, a formação de dímeros pode levar a diminuição da produção de oxigênio singleto, o que para a TFD é um efeito indesejado e que prejudica o processo terapêutico (KHADIEVA *et al.*, 2021). Segundo Rogério Antônio Sartori e colaboradores (2011), quando há NPs com sítios suficientes para que as moléculas de AM sejam adsorvidas na forma de monômeros, as chances de essas moléculas de AM se agregarem são reduzidas (SARTORI *et al.*, 2011). Com isso, é possível que no presente trabalho a quantidade de AM ofertada ( $270 \mu\text{mol.L}^{-1}$ ) tenha sido alta o suficiente a ponto de muitos monômeros de AM não se ligarem às SPIONs e, assim, ficarem livres para se agregarem e formar dímeros. Também é possível que a grande quantidade de dias em que o sistema SPIONs-PSSS-AM ficou em contato pode ter contribuído para a agregação dos monômeros de AM.

Desta forma, os sistemas A5 e A7 mostraram-se mais promissores como matriz magnética com potencial aplicação em TFD, uma vez que a **Figura 10** revela não haver formação de dímeros e, desta forma, não há redução da produção de oxigênio singleto, fazendo com que o processo fotodinâmico possa ocorrer sem empecilhos. Ainda, a amostra A5 pode ser o sistema SPIONs-PSSS-AM escolhido devido a que apresenta um resultado satisfatório, bem como utiliza uma quantidade menor de PSSS. Além disso, segundo Nemi Malhotra *et al.* (2020), a toxicidade das NPs magnéticas depende de diversos fatores, incluindo a dose e a concentração. Com

isso, quanto maior o número de SPIONs, maiores os riscos de essas NPs apresentarem toxicidade para as células (MALHOTRA *et al.*, 2020). Desta forma, é possível que a proporção de SPIONs de 1/20 apresente poucas chances de causar toxicidade para as células, uma vez que 1/20 é um valor baixo e, por isso, pode ser benéfico para a TFD.

A **Figura 12** mostra a curva de calibração do AM obtida na faixa de 1-20  $\mu\text{mol.L}^{-1}$ . Além disso, sabendo a quantidade de AM que foi conjugado às SPIONs-PSSS é possível dizer qual sistema SPIONs-PSSS-AM pode apresentar uma relevância maior do ponto de vista fotoquímico, o que para a aplicação na TFD é muito importante.

**Figura 12** - Curva de calibração do AM.



Fonte: o autor, 2022.

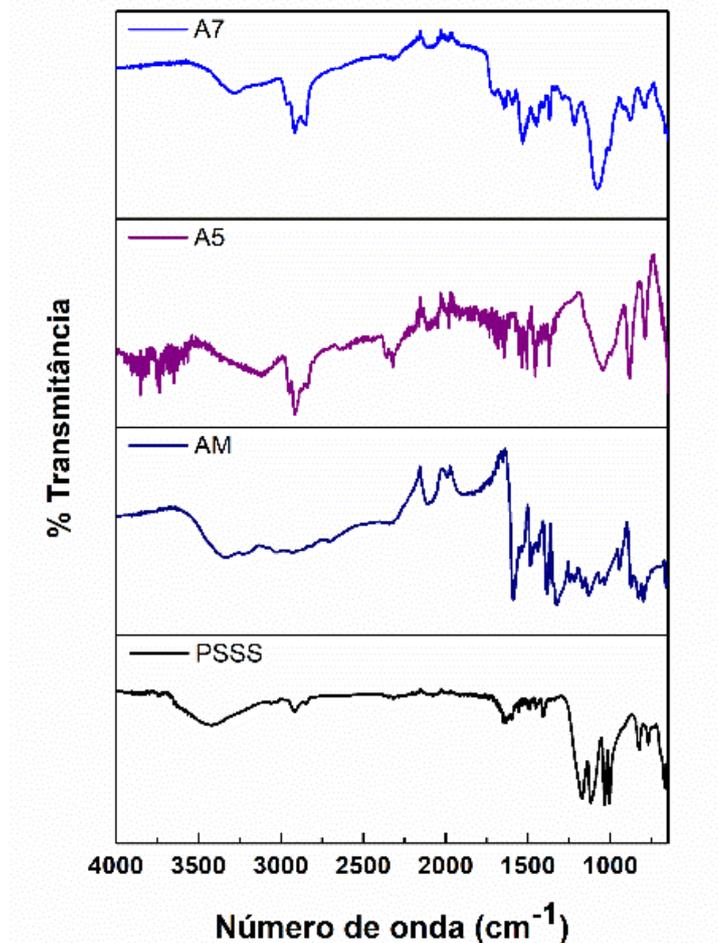
Utilizando a equação da reta gerada pela curva de calibração, foi possível determinar a eficiência da conjugação do AM na matriz SPIONs-PSSS para as amostras A5 e A7. Uma maior eficiência da conjugação pode ser obtida quando o seu valor fica mais próximo de 100%. Isto indica que a quantidade de AM no sobrenadante é pequena e que a maior parte do AM ficou adsorvida na superfície da matriz magnética. Os resultados obtidos foram considerados satisfatórios e os valores de conjugação para as amostras A5 e A7 foram 89,6% e 90,2%, respectivamente. Ressalta-se que a amostra A5 não apresentou evidências de formação de dímeros (**Figura 10**).

## 5.5 CARACTERIZAÇÃO DOS SISTEMAS

O valor do potencial zeta das amostras A5 e A7 foram -22,0 mV e -22,2 mV, respectivamente. Comparando estes dados com os achados nas amostras P1 e P2 (sem adição do AM), observa-se que a presença do AM (solução catiônica) pode ser suportada pelos valores menos negativos, ou seja, mais positivos. Assim, sabendo que o AM é uma molécula catiônica e que por isso apresenta um potencial zeta positivo, é possível inferir que o AM foi o responsável por essa mudança nos valores do potencial zeta e que isso mostra a presença do mesmo nos sistemas preparados.

As amostras A5 e A7 foram também analisadas por infravermelho com o intuito de suportar os resultados apresentados pelo potencial zeta, isto é, a conjugação satisfatória do AM na matriz magnética proposta. A **Figura 13** mostra o perfil das amostras A5 e A7, assim como das amostras de PSSS e AM.

**Figura 13** - Espectros do infravermelho das amostras A5, A7, PSSS e AM.



Fonte: o autor, 2022.

Segundo Guodong Su *et al.* (2018), para o AM o perfil de banda no infravermelho próximo de  $3417\text{ cm}^{-1}$  corresponde a ligação entre oxigênio e hidrogênio, enquanto o número de bandas entre  $1142\text{-}1490\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído às duplas ligações entre carbonos e, por fim, o número de onda igual a  $1599\text{ cm}^{-1}$  pode ser atribuído à ligação entre nitrogênio e hidrogênio (SU *et al.*, 2018). É possível inferir que o AM está presente nas amostras A5 e A7 fazendo uma comparação entre os perfis de banda mencionados. Assim, quando se compara o perfil da banda de número de onda próximo de  $1599\text{ cm}^{-1}$  do AM com o mesmo comprimento nas amostras A5 e A7 é possível inferir que o AM está presente nas amostras, pois os perfis de banda são bastante semelhantes e que por isso o AM foi conjugado às SPIONs-PSSS.

## 6 CONCLUSÃO

Com base nos métodos de caracterização realizados, é possível suportar que houve a devida funcionalização das SPIONs com o polímero PSSS, assim como a conjugação efetiva do AM com as NPs superparamagnéticas. Desta forma, pode-se concluir que foi desenvolvida uma nanoplataforma com potencial terapêutico para ser utilizada na TFD, uma vez que o sistema SPIONs-PSSS-AM preparado apresenta características fotoquímicas pela presença do AM e o superparamagnetismo pela presença das SPIONs, oferecendo características que podem melhorar o efeito biológico desejado na TFD.

Também foi possível observar que utilizar uma quantidade menor de SPIONs e PSSS foi mais benéfico, uma vez que a nanoplataforma apresentou as características desejadas mesmo nas menores quantidades ofertadas. Desta forma, neste trabalho foi desenvolvido uma estratégia de síntese simples e eficiente.

## REFERÊNCIAS

- ANTONIO SARTORI, R. *et al.* ADSORÇÃO DO CORANTE AZUL DE METILENO EM PARTÍCULAS DE ARGILOMINERAIS: ANÁLISE DOS TAMANHOS DAS PARTÍCULAS. **Quim. Nova**, v. 34, n. 4, p. 584–588, 2011.
- BERG, J. M. *et al.* The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to in vitro toxicological evaluations. **Nanotoxicology**, v. 3, n. 4, p. 276–283, 2009.
- BOLTES CECATTO, R. *et al.* Methylene blue mediated antimicrobial photodynamic therapy in clinical human studies: The state of the art. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 31, 1 set. 2020.
- BOTWINA, P. *et al.* In vitro inhibition of Zika virus replication with poly(sodium 4-styrenesulfonate). **Viruses**, v. 12, n. 9, 1 set. 2020.
- BRITO, E. L. *et al.* Superparamagnetic magnetite/IPEC particles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 560, p. 376–383, 5 jan. 2019.
- CABRERA, M. P. *et al.* Highly fluorescent and superparamagnetic nanosystem for biomedical applications. **Nanotechnology**, v. 28, n. 28, 23 jun. 2017.
- CHEN, Y. L. *et al.* Toxicity analysis of poly(sodium-4-styrenesulfonate) coated graphene on HMEC-1 cells under dynamic conditions mimicking blood flow. **RSC Advances**, v. 7, n. 82, p. 51910–51918, 2017.
- CHILAKAMARTHI, U.; GIRIBABU, L. Photodynamic Therapy: Past, Present and Future. **Chemical Record**, v. 17, n. 8, p. 775–802, 1 ago. 2017.
- CLOGSTON, J. D.; PATRI, A. K. Zeta potential measurement. **Characterization of Nanoparticles Intended for Drug Delivery**. [s.l.: s.n.]. v. 697p. 63–70.
- COLOMBO, M. *et al.* Biological applications of magnetic nanoparticles. **Chemical Society Reviews**, v. 41, n. 11, p. 4306–4334, 15 maio 2012.
- DE SANTANA, W. M. O. S. *et al.* Conjugation of superparamagnetic iron oxide nanoparticles and curcumin photosensitizer to assist in photodynamic therapy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 196, 1 dez. 2020.
- DICKSON, D. P. E.; FRANKEL, R. B. Magnetic Fine Particles in Biological Systems. **Magnetic Properties of Fine Particles**, p. 393–402, 1992.
- DOBSON, J.; DE QUEIROZ, G. F.; GOLDING, J. P. Photodynamic therapy and diagnosis: Principles and comparative aspects. **Veterinary Journal**, v. 233, p. 8–18, 1 mar. 2018.
- DONOHUE, C. *et al.* Cell death in photodynamic therapy: From oxidative stress to anti-tumor immunity. **Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer**, v. 1872, n. 2, 1 dez. 2019.

ENRIQUEZ-NAVAS, P. M.; GARCIA-MARTIN, M. L. Application of inorganic nanoparticles for diagnosis based on MRI. **Frontiers of Nanoscience**, v. 4p. 233–245, 2012.

FALES, A. M.; YUAN, H.; VO-DINH, T. Silica-coated gold nanostars for combined surface-enhanced Raman scattering (SERS) detection and singlet-oxygen generation: A potential nanoplatform for theranostics. **Langmuir**, v. 27, n. 19, p. 12186–12190, 4 out. 2011.

FUDIMURA, K. A. *et al.* Synthesis and characterization of methylene blue-containing silica-coated magnetic nanoparticles for photodynamic therapy. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 17, n. 1, p. 133–142, 2017.

GONÇALVES, B. J. A.; FIGUEIREDO, K. C. DE S. Adsorção de ácido acético em carvão ativado para o ensino de adsorção. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v. 6, n. 5, p. 0704–0708, 12 dez. 2020.

HARRIS, F. *et al.* An investigation into the potential of phenothiazinium-based photosensitisers to act as PDT agents. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 1, n. 3, p. 231–239, 2004.

HUANG, Z. A Review of Progress in Clinical Photodynamic Therapy. **Technology in Cancer Research & Treatment**, v. 4, n. 3, p. 283–293, 24 jun. 2005.

ISSA, M. C. A.; MANELA-AZULAY, M. Terapia fotodinâmica: revisão da literatura e documentação iconográfica. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 4, p. 501–511, ago. 2010.

JANKO, C. *et al.* Functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs) as platform for the targeted multimodal tumor therapy. **Frontiers in Oncology**, v. 9, n. FEB, 2019.

JAVALI, M. A. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy (light source; methylene blue; titanium dioxide): Bactericidal effects analysis on oral plaque bacteria: An in vitro study. **Nigerian Journal of Clinical Practice**, v. 22, n. 12, p. 1654–1661, 1 dez. 2019.

JESUS, V. P. S. *et al.* Nanoparticles of methylene blue enhance photodynamic therapy. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 23, p. 212–217, 1 set. 2018.

JI, C. *et al.* Sorption enhancement of nickel(II) from wastewater by ZIF-8 modified with poly (sodium 4-styrenesulfonate): Mechanism and kinetic study. **Chemical Engineering Journal**, v. 414, 15 jun. 2021.

JI, D. *et al.* Poly(sodium-4-styrene sulfonate) (PSSNa)-assisted transferable flexible, top-contact high-resolution free-standing organic field-effect transistors. **RSC Advances**, v. 5, n. 119, p. 98288–98292, 2015.

JOSE, J. *et al.* Magnetic nanoparticles for hyperthermia in cancer treatment: an emerging tool. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 27, n. 16, p. 19214–19225, 1 jun. 2020.

KALKA, K.; MERK, H.; MUKHTAR, H. Photodynamic therapy in dermatology. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 42, n. 3, p. 389–413, mar. 2000.

KANDELA, I. K.; BARTLETT, J. A.; INDIG, G. L. Effect of molecular structure on the selective phototoxicity of triarylmethane dyes towards tumor cells. **Photochemical and Photobiological Sciences**, v. 1, n. 5, p. 309–314, 17 maio 2002.

KHADIEVA, A. *et al.* Arylamine analogs of methylene blue: Substituent effect on aggregation behavior and dna binding. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 11, 1 jun. 2021.

KIM, M. M.; DARAFSHEH, A. Light Sources and Dosimetry Techniques for Photodynamic Therapy. **Photochemistry and Photobiology**, v. 96, n. 2, p. 280–294, 1 mar. 2020.

KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy – mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, 1 out. 2018.

LEI, Z.; LI, Y.; WEI, X. A facile two-step modifying process for preparation of poly(SSStNa)-grafted Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub> particles. **Journal of Solid State Chemistry**, v. 181, n. 3, p. 480–486, mar. 2008.

LIM, D. J. Methylene blue-based nano and microparticles: Fabrication and applications in photodynamic therapy. **Polymers**, v. 13, n. 22, 1 nov. 2021.

LIM, E. J. *et al.* Methylene blue-mediated photodynamic therapy enhances apoptosis in lung cancer cells. **Oncology Reports**, v. 30, n. 2, p. 856–862, ago. 2013.

LINK, E. M. Targeting Melanoma with 211 At/<sup>13</sup>Λ-Méthylène Blue: Preclinical and Clinical Experience. **HYBRIDOMA**, v. 18, n. 1, p. 77–82, 1999.

LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 46, n. 8, p. 1222–1244, 2007.

LUCKY, S. S.; SOO, K. C.; ZHANG, Y. Nanoparticles in photodynamic therapy. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 4, p. 1990–2042, 25 fev. 2015.

LUNARDI, C. N. *et al.* Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. **Canadian Journal of Chemical Engineering**, v. 99, n. 3, p. 627–639, 1 mar. 2021.

MACDONALD, I. J.; DOUGHERTY, T. Basic principles of photodynamic therapy. **Journal of Porphyrins and Phthalocyanines**, v. 5, n. 2, p. 105–129, fev. 2001.

MAHMOUDI, M. *et al.* Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy. **Advanced Drug Delivery Reviews**, jan. 2011.

MALHOTRA, N. *et al.* Potential toxicity of iron oxide magnetic nanoparticles: A review. **Molecules**, v. 25, n. 14, 1 jul. 2020.

MARGHUSSIAN, V. Magnetic Properties of Nano-Glass Ceramics. **Nano-Glass Ceramics**. 2015. p. 181–223.

MATOBA, Y. *et al.* Clinical application of photodynamic diagnosis and photodynamic therapy for gynecologic malignant diseases: A review. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**. 1 dez. 2018.

NAKAMURA, M.; KATAGIRI, K.; KOUMOTO, K. Preparation of hybrid hollow capsules formed with Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and polyelectrolytes via the layer-by-layer assembly and the aqueous solution process. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 341, n. 1, p. 64–68, 1 jan. 2010.

NASCIMENTO, R. F. DO *et al.* **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**.

NG, Q. H. *et al.* Enhance the colloidal stability of magnetite nanoparticles using poly(sodium 4-styrene sulfonate) stabilizers. **Applied Mechanics and Materials**, v. 625, p. 168–171, 2014.

NINGTHOUJAM, R. S. Synthesis and Characterization of Borides, Carbides, and Nitrides and Their Applications. **Materials Under Extreme Conditions: Recent Trends and Future Prospects**. p. 337–375, 2017.

OH, J. K.; PARK, J. M. Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. **Progress in Polymer Science (Oxford)**, v. 36, n. 1, p. 168–189, 2011.

PANKHURST, Q. A. *et al.* Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v. 36, p. 167–181, 2003.

PASQUALE, V. Curie Temperature. **Encyclopedia of Earth Sciences Series**, v. PartF4, 2020.

PIAZZA, R. D. *et al.* PEGlatyon-SPION surface functionalization with folic acid for magnetic hyperthermia applications. **Materials Research Express**, v. 7, n. 1, 2020.

PRAZMO, E. J. *et al.* Photodynamic therapy as a promising method used in the treatment of oral diseases. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 25, n. 4, p. 799–807, 1 jul. 2016.

RAJESH, S. *et al.* Antimicrobial photodynamic therapy: An overview. **Journal of Indian Society of Periodontology**, out. 2011.

RASMUSSEN, M. K.; PEDERSEN, J. N.; MARIE, R. Size and surface charge characterization of nanoparticles with a salt gradient. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 1 dez. 2020.

RODRIGUES, C. H. *et al.* Silver nanoprisms as plasmonic enhancers applied in the photodynamic inactivation of *Staphylococcus aureus* isolated from bubaline mastitis. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 34, 1 jun. 2021.

SAFARIK, I.; SAFARIKOVA, M. Magnetic Nanoparticles and Biosciences. **Monatshefte für Chemie / Chemical Monthly**, v. 133, p. 737–759, 2002.

SAMIMI, S. *et al.* Lipid-Based Nanoparticles for Drug Delivery Systems. **Characterization and Biology of Nanomaterials for Drug Delivery: Nanoscience and Nanotechnology in Drug Delivery**. p. 47–76, 2018

SAMROT, A. V. *et al.* Adsorption efficiency of chemically synthesized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles (SPIONs) on crystal violet dye. **Current Research in Green and Sustainable Chemistry**, v. 4, 1 jan. 2021.

SEVERINO, D. *et al.* Influence of Negatively Charged Interfaces on the Ground and Excited State Properties of Methylene Blue. **Photochemistry and Photobiology**.

SHUBAYEV, V. I.; PISANIC, T. R.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, n. 6, p. 467–477, 21 jun. 2009.

SILVEIRA, M. L. D. C.; SILVA, I. M. B.; MAGDALENA, A. G. Synthesis and characterization of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub> and Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>-NH<sub>2</sub>-chitosan nanoparticles. **Ceramica**, v. 67, n. 383, p. 295–300, 1 jul. 2021.

SONG, D. *et al.* Photodynamic therapy using methylene blue to treat cutaneous leishmaniasis. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 29, n. 10, p. 711–715, 1 out. 2011.

SU, G. *et al.* Adsorption Kinetics and Adsorption Isotherm of Methylene Blue on Magnetic 0.9NiFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>/0.1SiO<sub>2</sub> Nanocomposites Prepared via a Rapid Combustion Process. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 18, n. 4, p. 2665–2672, 10 nov. 2017.

TADA, D. B. *et al.* Methylene blue-containing silica-coated magnetic particles: A potential magnetic carrier for photodynamic therapy. **Langmuir**, v. 23, n. 15, p. 8194–8199, 17 jul. 2007.

TAFULO, P. A. R.; QUEIRÓS, R. B.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. On the “concentration-driven” methylene blue dimerization. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 73, n. 2, p. 295–300, 15 jul. 2009.

TARDIVO, J. P. *et al.* Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 2, n. 3, p. 175–191, set. 2005.

TAVARES COSTA, H. R. *et al.* Experimental study of the neurotoxic effects of photodynamic therapy on the spinal cord. **Coluna/ Columna**, v. 18, n. 3, p. 176–181, 2019.

TEICHERT, M. C. *et al.* Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 93, n. 2, p. 155–160, 2002.

TOLEDO, V. H. *et al.* Methylene blue-covered superparamagnetic iron oxide nanoparticles combined with red light as a novel platform to fight non-local bacterial infections: A proof of concept study against *Escherichia coli*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 209, 1 ago. 2020.

TURCHIELLO, R. F. *et al.* Methylene blue-mediated Photodynamic Therapy in human retinoblastoma cell lines. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 222, 1 set. 2021.

VON DER LÜHE, M. *et al.* SPION@polydehydroalanine hybrid particles. **RSC Advances**, v. 5, n. 40, p. 31920–31929, 2015.

WAGNER, M. *et al.* Methylene blue photodynamic therapy in malignant melanoma decreases expression of proliferating cell nuclear antigen and heparanases. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 37, n. 5, p. 527–533, jul. 2012.

WAHAJUDDIN; ARORA, S. Superparamagnetic iron oxide nanoparticles: Magnetic nanoplatforms as drug carriers. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 3445–3471, 2012.

WANG, H. *et al.* Light-controlled oxygen production and collection for sustainable photodynamic therapy in tumor hypoxia. **Biomaterials**, v. 269, 1 fev. 2021.

WARRIER, A. *et al.* Photodynamic therapy to control microbial biofilms. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 33, 1 mar. 2021.

WILLIAMS, M. J. *et al.* Microwave-assisted synthesis of highly crystalline, multifunctional iron oxide nanocomposites for imaging applications. **RSC Advances**, v. 6, n. 87, p. 83520–83528, 2016.

WO, R. *et al.* Preparation and Characterization of Functionalized Metal-Organic Frameworks with Core/Shell Magnetic Particles (Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>@SiO<sub>2</sub>@MOFs) for Removal of Congo Red and Methylene Blue from Water Solution. **Journal of Chemical and Engineering Data**, v. 64, n. 6, p. 2455–2463, 13 jun. 2019.

YEAP, S. P. *et al.* On size fractionation of iron oxide nanoclusters by low magnetic field gradient. **Journal of Physical Chemistry C**, v. 118, n. 41, p. 24042–24054, 16 out. 2014.

YEAP, S. P. *et al.* Manipulating cluster size of polyanion-stabilized Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> magnetic nanoparticle clusters via electrostatic-mediated assembly for tunable magnetophoresis behavior. **Journal of Nanoparticle Research**, v. 17, n. 10, 1 out. 2015.

YU, J. *et al.* Development of therapeutic au-methylene blue nanoparticles for targeted photodynamic therapy of cervical cancer cells. **ACS Applied Materials and Interfaces**, v. 7, n. 1, p. 432–441, 14 jan. 2015.

ZHANG, L. *et al.* Fabrication of Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>/PAH/PSS@Pd core-shell microspheres by layer-by-layer assembly and application in catalysis. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 421, p. 1–5, 1 mai 2014.

ZHENG, L. *et al.* Multi-color lasing in chemically open droplet cavities. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

ZHU, S. *et al.* A novel conversion of the groundwater treatment sludge to magnetic particles for the adsorption of methylene blue. **Journal of Hazardous Materials**, v. 292, p. 173–179, 5 jul. 2015.