

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 07/05/2021.

Willian Max Oliveira de Souza de Santana

Conjugação de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e curcumina: associação da terapia fotodinâmica e hipertermia magnética

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química de Araraquara, da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Celso Valentim Santilli

Coorientadora: Prof^a. Dra. Carla Raquel Fontana

**-Araraquara-
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

S231c	<p>Santana, Willian Max Oliveira de Souza de Conjugação de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e curcumina : associação da terapia fotodinâmica e hipertermia magnética / Willian Max Oliveira de Souza de Santana. – Araraquara-SP : [s.n.], 2019 91 f. : il.</p> <p>Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química Orientador: Celso Valentim Santilli Coorientador: Carla Raquel Fontana</p> <p>1. Óxido de ferro. 2. Curcumina. 3. Fotoquimioterapia. 4. Termoterapia. 5. <i>Staphylococcus aureus</i>. I. Título.</p>
-------	--

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

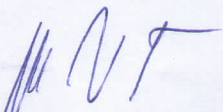
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Conjugação de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e curcumina: associação da terapia fotodinâmica e hipertermia magnética"

AUTOR: WILLIAN MAX OLIVEIRA DE SOUZA DE SANTANA

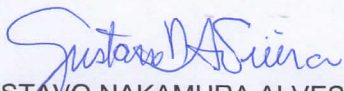
ORIENTADOR: CELSO VALENTIM SANTILLI

COORIENTADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

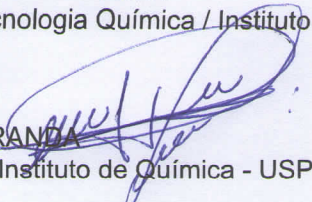
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. CELSO VALENTIM SANTILLI
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. GUSTAVO NAKAMURA ALVES VIEIRA
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química / Instituto de Química - UNESP - Araraquara



Prof. Dr. LAUDEMIR CARLOS VARANDA
Departamento de Físico-Química / Instituto de Química - USP - São Carlos

Araraquara, 07 de maio de 2019

DADOS CURRICULARES

Identificação

Nome: Willian Max Oliveira de Souza de Santana

Nome em citações bibliográficas: SANTANA, W. M. O. S.

Endereço profissional

Rua Prof. Francisco Degni, 55.

Bairro: Quitandinha

CEP:14800-060 - Araraquara, SP

Email: maxoliveira010@gmail.com

Formação acadêmica

2012-2016: Graduação em Licenciatura em Química na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus Araraquara.

Bolsas e estágios

-Bolsa de apoio acadêmico e extensão I no projeto “Palestra na Escola”, sob orientação do Prof. Dr. Marco Aurélio Cebim, no período de 04/2012 a 03/2013;

-Monitoria voluntária no curso de difusão de conhecimento “Inclusão digital para a comunidade”, sob orientação da Prof^a. Dra. Julia Sawaki Tanaka, no período de 08/2012 a 12/2012;

-Estágio remunerado no laboratório de ciências na Escola Estadual “Professor Joaquim Pinto Machado Junior ‘Machadinho’”, no período de 11/03/2013 a 11/09/2013 realizado através da Fundação do Desenvolvimento Administrativo (Fundap);

-Bolsa de monitoria na disciplina "Cálculo Diferencial e Integral I e II", do curso de Licenciatura em Química, junto ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química (UNESP-Campus Araraquara), sob orientação do Prof. Dr. Jorge Manuel Vieira Capela, no período de 04/2013 a 07/2013;

-Bolsa de Intercâmbio (Graduação Sanduíche) na Universidade de Coimbra pelo Programa de Licenciaturas Internacionais pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), no período entre 09/2013 e 08/2015;

-Bolsa de iniciação científica pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no projeto intitulado “Materiais Híbridos Orgânicos-Inorgânicos para liberação guiada e monitorada de fármacos”, sob orientação do Prof. Dr. Celso Valentim Santilli, no período de 11/2015 a 11/2016;

-Monitoria voluntária na disciplina "Pré-Cálculo" do Curso de Licenciatura em Química, junto ao Departamento de Físico-Química do Instituto de Química (UNESP-Campus Araraquara), sob orientação do Prof. Dr. Ricardo Sá Teles, no período de 03/2016 a 06/2016;

-Monitoria voluntária na disciplina “Metodologia e Prática do Ensino de Química” do Curso de Licenciatura em Química, junto ao Departamento de Didática da Faculdade de Ciências e Letras (UNESP-Campus Araraquara), sob orientação da Prof^a. Dra. Luciana Massi, no período de 08/2016 a 12/2016;

-Bolsa de Mestrado, no período de 02/2017 a 11/2017 pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e no período de 11/2017 a 02/2019 pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), com o projeto de pesquisa “Conjugação de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e curcumina: associação da terapia fotodinâmica e hipertermia magnética”, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus Araraquara.

Apresentação de trabalhos em congressos

-SANTANA, W. M. O. S.; FINI, R; CAETANO, B. L.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. Estudo de matrizes ureasil-polieter contendo CoFe_2O_4 para aplicações biomédicas: liberação controlada de fármaco e hipertermia magnética. XXVIII Congresso de iniciação científica da UNESP- 2^a fase, Bauru-SP, 2016.

-SANTANA, W. M. O. S.; CAETANO, B. L.; MENAGER, C.; FONTANA, C. R.; SANTILLI, C. V. Conjugation of superparamagnetic nanoparticles of iron oxide and curcumin: Combining photodynamic therapy and magnetic hyperthermia. XVII Brazilian Materials Research Society (SBPMat), Natal-RN, 2018

-SANTANA, W. M. O. S.; CAETANO, B. L.; MENAGER, C.; PULCINELLI, S. H.; SANTILLI, C. V. A influência da proporção de nanopartículas de óxido de ferro em nanocompósitos ureasil-poliéter na liberação controlada de curcumina e na hipertermia

magnética. 23º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais (CBECIMat), Foz do Iguaçu-PR, 2018

Participação em comissões organizadoras

-Participação na Comissão Organizadora do XIV Evento de Educação em Química (EVEQ) com o tema “Planejamento didático-pedagógico no ensino de química: possibilidades e desafios para a prática inovadora”, ocorrido em 2016;

Prêmios

-Prêmio de 3% dos melhores estudantes da Universidade de Coimbra no ano letivo de 2014/2015, obtido durante a graduação sanduíche;

AGRADECIMENTOS

À toda minha família pelo apoio e incentivo, direto e indireto. Aos meus avós maternos (Helena e Vivaldo) e paternos (Lia e Jaime) por terem sido o alicerce e o porto seguro dos meus pais e por consequência, os meus. À minha mãe pelo apoio e amor incondicional. Ao meu pai pelo incentivo e exemplo de perseverança. À minha “boadrasta” Tia Rene por me acolher e apoiar como um filho. À minha Tia Madrinha Rosa pelo incentivo, apoio e carinho especial. À minha irmã pelo carinho.

Aos meus orientadores Prof. Celso e Prof^{ra}. Carla pelos ensinamentos, apoio, respeito e compreensão.

Ao Dr. Bruno Caetano pelos ensinamentos, incentivo, generosidade e amizade.

À Prof^{ra} Christine Ménager pelas medidas de microscopia eletrônica de transmissão e magnetização.

Ao Grupo de pesquisa de Biofotônica pelo acolhimento e compartilhamento de experiência. À Malu, Laís e Lucas pela boa vivência e solicitude. Em especial, à Sarah por me ensinar os experimentos microbiológicos e ter-se mostrado uma pessoa muito especial, generosa e humilde.

Ao Grupo de Físico-química de Materiais (GFQM) pelo bom ambiente de trabalho e por ofertar todo o suporte para a realização deste trabalho.

Ao Instituto de Química por tudo que me ofereceu desde a graduação.

Ao ensino público, gratuito e de qualidade por me permitir acesso e permanência na universidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas (processo FAPESP n.º 2017/07822-7) e auxílios concedidos.

Aos colegas e amigos presentes nestes dois anos por dividir a carga emotiva, amenizar a ansiedade, compartilhar bons momentos, apoiar nas dúvidas e certezas, por ouvir as lamúrias, pela compreensão e empatia.

Dedico este trabalho aos meus queridos avós, à minha mãe e minha irmã.

RESUMO

A incidência de infecções cutâneas causadas por agentes bacterianos resistentes ao tratamento convencional com antibióticos tornou-se um grande problema de saúde pública. Algumas abordagens terapêuticas alternativas têm sido propostas, dentre elas a terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT) e hipertermia magnética (HM). A aPDT envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) por meio da combinação de luz, oxigênio molecular e um agente fotossensibilizador (FS), e a HM promove o aumento da temperatura de uma região anatômica submetendo nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONPs) a um campo magnético alternado (CMA). O FS de escolha para este estudo foi a curcumina (CUR), muito usado em aPDT, porém tem a fotoavidez fortemente afetada em meios aquosos devido à tendência a agregação. Visando evitar isto, além de promover a melhoria da administração da CUR e a combinação de aPDT e HM num único material foi proposto neste trabalho a síntese de conjugados SPIONP-curcumina (Magh-CUR), assim como a sua avaliação em aPDT e HM contra *Staphylococcus aureus* em fase planctônica. Este material magnético foi preparado por uma metodologia de coprecipitação alcalina seguida por uma etapa de conjugação com a CUR. Os conjugados foram caracterizados por difração de raios X, microscopia eletrônica de transmissão, potencial zeta, espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier, termogravimetria, magnetometria e ensaios de HM. Os resultados evidenciaram que as nanopartículas de Magh-CUR obtidas apresentaram morfologia esférica e tamanho médio de ~ 15 nm e que a conjugação de CUR se dá por interações fracas e por ligações entre o grupo ceto-enol da CUR com os íons de ferro presentes na superfície das SPIONPs. Além disso, os conjugados apresentaram poder de aquecimento sob CMA e ação fotodinâmica quando irradiados com luz de LEDs azul. Nos experimentos microbiológicos de aPDT foi demonstrado que o conjugado consegue promover redução total da carga bacteriana numa dose de luz de 3,12 J.cm⁻². Os ensaios de liberação *in vitro* dos conjugados evidenciaram que a liberação de CUR foi dependente da temperatura. Desta forma, os conjugados Magh-CUR se mostraram promissores para aplicações biológicas, pois permitem associar a aPDT com HM e nanocarreamento da CUR num mesmo sistema.

Palavras-Chave: óxido de ferro; curcumina; fotoquimioterapia; termoterapia; *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The incidence of cutaneous infections caused by bacteria resistant to conventional antibiotic treatment has become a major public health problem. Some alternative therapeutic approaches have been proposed, among them antimicrobial photodynamic therapy (aPDT) and magnetic hyperthermia (MH). The aPDT involves the generation of reactive oxygen species (ROS) by using the combination of light, molecular oxygen and a photosensitizing agent (PS), and MH promotes temperature increase of an anatomic region by subjecting superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONPs) to an alternating magnetic field (AMF). The PS of choice for this study was curcumin (CUR), widely used in aPDT, but still has its photoactivity strongly affected in aqueous media due to the tendency of aggregation. In order to solve this problem and to promote the improvement of the administration of CUR, we propose the combination of CUR and SPIONPs of maghemite in a single material. Therefore, the objective of this work was to synthesize a SPIONPs-curcumin conjugate (Magh-CUR) and, mediated by the aPDT, to evaluate it against *Staphylococcus aureus* in the planktonic phase. This magnetic material was prepared by an alkaline coprecipitation method followed by a conjugation step with CUR. The conjugates were characterized by X-ray diffraction, electron transmission microscopy, zeta potential, infrared spectroscopy with Fourier transform, thermogravimetry, magnetometry, MH assays. The characterizations showed that the Magh-CUR had spheroid forms with sizes of ~ 15 nm and the conjugation was due to strong interactions between the CUR keto-enol group and the iron ions on the surface of the SPIONPs. In addition, the conjugates showed high heating power under CMA and photodynamic action when irradiated with blue LEDs light. In the microbiological experiments of aPDT it was shown that the conjugate can promote total reduction of the bacterial load in a low dose of light. The *in vitro* release assays of the conjugates showed that the release of CUR was dependent on temperature. In this way, the Magh-CUR conjugates are interesting materials for biological applications, since they allow to associate the aPDT with MH and drug delivery of the CUR in the same material.

Keywords: iron oxide; curcumin; photochemotherapy; thermotherapy; *Staphylococcus aureus*.

LISTA DE ABREVIACOES

CMA	Campo magnético de frequência alternada
Ce6	Clorina-e6
CSI	Cruzamento intersistema
CUR	Curcumina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DRX	Difração de raios X
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FS	Fotossensibilizador
HM	Hipertermia magnética
IONPs	<i>Iron oxide nanoparticles</i>
IUPAC	<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>
LED	<i>Light-emitting diode</i>
MET	Microscopia eletrônica de transmissão
MHT	Magnetohipertermia
MIC	<i>Minimal inhibitory concentration</i>
MSSA	<i>Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDI	<i>Photodynamic inactivation</i>
PDT	<i>Photodynamic therapy</i>
aPDT	<i>antimicrobial photodynamic therapy</i>
TG	Termogravimetria
TSA	<i>Tryptic soy agar</i>
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>
SLP	<i>Specific loss power</i>
SPIONPs	<i>Superparamagnetic iron oxide nanoparticles</i>
SOD	Superóxido dismutase
UFC	Unidades formadoras de colônias
VSM	<i>Vibrating sample magnetometer</i>

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estruturas de alguns fotossensibilizadores porfirínicos (esquerda) e não-porfirínicos (direita).....22
- Figura 2:** Representação dos processos fotofísicos e fotoquímicos envolvidos na geração de EROs pelo fotossensibilizador.....23
- Figura 3:** Representação das etapas do tratamento da terapia fotodinâmica e da ação localizada da geração de EROs em células bacterianas.....25
- Figura 4:** Estruturas químicas dos principais curcuminóides presentes no pó amarelo extraído dos rizomas da planta *curcuma longa*. No lado direito estão representadas as estruturas dos principais produtos de degradação da curcumina em meio aquoso.....27
- Figura 5:** Representação da estrutura cristalina da magnetita e maghemita (esquerda) e esquema da mudança no magnetismo nos nanomateriais (direita).....31
- Figura 6:** Curva de magnetização de materiais ferrimagnéticos e superparamagnéticos33
- Figura 7:** Representação do uso de SPIONPs sob um campo magnético externo de frequência alternada (CMA) para promover HM em células cancerígenas.35
- Figura 8:** Diagrama esquemático da síntese da maghemita.....44
- Figura 9:** (a) Espectros na região do visível para a curcumina em diferentes concentrações, dispersa em tampão fosfato a pH 7,2 com 0,5 % m/m do surfactante tween 80 e (b) curva analítica obtida..... 49
- Figura 10:** Esquema do experimento da terapia fotodinâmica.....52
- Figura 11:** (a) Curvas termogravimétricas da curcumina, Magh e Magh-CUR sob atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) em uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$; (b) Derivada primeira das curvas termogravimétricas.....54
- Figura 12:** Curvas termogravimétricas sob atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) em uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ dos conjugados Magh-CUR preparados variando (a) a concentração de CUR e mantendo fixo o pH 5,5 e 25% etanol; (b) pH e mantendo fixo a concentração de CUR = $0,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e 25% etanol; (c) proporção de etanol e mantendo fixo a concentração de CUR = $0,4 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e pH 5,5..... 56
- Figura 13:** (a) Difractogramas de raios X das amostras de Magh e Magh-CUR e dos padrões de magnetita e maghemita.....58
- Figura 14:** (a) Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão e (b) histograma de distribuição de tamanho da amostra Magh. (c) Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão e (d) histograma de distribuição de tamanho da amostra Magh-CUR.....60

Figura 15: (a) Espectros de FTIR da curcumina, Magh e Magh-CUR. (b) Ampliação da região de 1850 a 900 cm^{-1} do FTIR.....	61
Figura 16: Representação da ligação entre a curcumina e as IONPs.....	63
Figura 17: Potencial zeta em função do pH de Magh e Magh-CUR em água deionizada na concentração de 0,05% (m/m), com força iônica ajustada (NaCl, 1 mM).....	63
Figura 18: Espectros de absorção na região do visível da curcumina ($4,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, Magh ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e Magh-CUR ($15 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) dispersos em tampão fosfato pH 7,2. A curva em verde é referente a subtração dos espectros de Magh-CUR e Magh.....	64
Figura 19: Curvas de magnetização de (a) Magh e (b) Magh-CUR em água deionizada.....	65
Figura 20: Curva de hipertermia magnética das suspensões coloidais de Magh ($12 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), em pH 4, e em diferentes combinações de campo e frequência.....	66
Figura 21: Curvas de hipertermia magnética das suspensões coloidais de (a) Magh (pH 4) e (b) Magh-CUR (pH 7,2) em diferentes concentrações, obtidas com aplicação de CMA com amplitude máxima de campo igual a $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e frequência de 280 kHz.....	68
Figura 22: Liberação da curcumina a pH 7,2 num meio aquoso com 0,5 % m/m tween 80 em diferentes temperaturas.....	70
Figura 23: Suspensões de <i>S. aureus</i> incubadas por 5 min com diferentes concentrações de CUR, dispersa em meio aquoso com 25% etanol, na condição sem irradiação (escuro) (a), e com irradiação LED azul nas doses de $12,5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (b), $6,25 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (c) e $3,12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (d).....	71
Figura 24: Suspensões de <i>S. aureus</i> incubadas por 5 min com diferentes concentrações de Magh, na condição sem irradiação, escuro, (a), e com irradiação LED azul na dose de $12,5 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (b).....	73
Figura 25: Suspensões de <i>S. aureus</i> incubadas por 24 h com diferentes concentrações de Magh e Magh-CUR no escuro.....	74
Figura 26: Suspensões de <i>S. aureus</i> incubadas por 5 min com diferentes concentrações dos conjugados Magh-CUR com e sem irradiação LED azul na dose de $3,12 \text{ J}\cdot\text{cm}^{-2}$ (escuro)	76
Figura 27: Suspensões de <i>S. aureus</i> incubadas por 20 min com os conjugados Magh-CUR nas concentrações de $4000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (a) e $2000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (b) com aplicação de um CMA ($H = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e $f = 280 \text{ kHz}$) durante 20 min.....	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Condições de síntese do conjugado Magh-CUR.....	45
Tabela 2: CUR adsorvida e ligada em Magh-CUR preparados em diferentes condições de síntese.....	57
Tabela 3: Distâncias interplanares, d , e parâmetros de rede, a , dos principais picos de difração das amostras e dos padrões de referência.....	59
Tabela 4: Valores de SLP e ΔT das suspensões coloidais de Magh (12 g.L^{-1}) em diferentes parâmetros de CMA.....	67
Tabela 5: Valores de SLP e ΔT das suspensões coloidais com diferentes concentrações de Magh e Magh-CUR medidas em CMA ($H = 15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e $f = 280 \text{ kHz}$).....	69

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Introdução	16
1.2 Terapia Fotodinâmica	18
1.2.1 Aspectos históricos.....	18
1.2.2 Aspectos gerais	19
1.2.3 Fotossensibilizador	20
1.2.3.1 Mecanismo fotofísico e fotoquímico da geração de EROs.....	22
1.2.4 Ação fotodinâmica antimicrobiana	24
1.3 Curcumina	26
1.4 Nanomateriais em Terapia Fotodinâmica	28
1.5 Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas (SPIONPs)	30
1.5.1 Síntese das SPIONPs	33
1.5.2 Aplicações biomédicas das SPIONPs.....	34
1.6 hipertermia Magnética	34
1.6.1 Mecanismos de dissipação de calor das SPIONPs.....	36

CAPÍTULO 2: MOTIVAÇÃO E OBJETIVOS

.....	40
-------	-----------

CAPÍTULO 3: PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Síntese do Ferrofluido	43
3.1.1 Síntese das nanopartículas de óxido de ferro	43
3.1.2 Determinação da concentração do ferrofluido	44
3.1.3 Efeito dos parâmetros de síntese do conjugado IONP-Curcumina	45
3.2 Técnicas de Caracterização	46

3.2.1 Termogravimetria (TG)	46
3.2.2 Difração de Raios X (DRX).....	46
3.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão (TEM)	46
3.2.4 Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier com acessório de zzz Total Atenuada (FTIR/ATR).....	47
3.2.5 Potencial zeta.....	47
3.2.6 Espectroscopia na região do UV-vis	47
3.2.7 Magnetometria de amostra vibrante	47
3.2.8 Hipertermia magnética	47
3.3 Liberação da Curcumina <i>in vitro</i>	48
3.4 Ensaio Microbiológicos em Fase Planctônica	49
3.4.1 Cepa bacteriana e meios de cultivo	50
3.4.2 Fotossensibilizador e fonte de luz.....	50
3.4.3 Terapia fotodinâmica, ensaios no escuro e de hipertermia magnética.....	50
3.4.4 Análise estatística.....	52
CAPÍTULO 4: RESULTADOS E DISCUSSÃO	
4.1 Efeito dos Parâmetros de Síntese do Conjugado Magh-CUR	54
4.2 Características das Amostras na forma de Pós	59
4.3 Características das Suspensões	63
4.4 Liberação da Curcumina <i>in vitro</i>	70
4.5 Ensaio Microbiológicos em Fase Planctônica	70
CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES	
.....	80
REFERÊNCIAS	82

1.1 Introdução

As infecções bacterianas voltaram a ser consideradas um grave problema de saúde em todo o mundo, uma vez que o tratamento convencional à base de antibióticos é cada vez mais ineficaz, causando internações prolongadas e altas taxas de mortalidade. Isto se deve ao aparecimento e disseminação de cepas bacterianas resistentes à múltiplas classes de antibióticos.¹ Em 2004, estimou-se que mais de 70% das cepas bacterianas patogênicas isoladas eram resistentes a pelo menos um dos antibióticos dentre aqueles disponíveis para o tratamento clínico.²

A resistência bacteriana a antimicrobianos pode ser classificada como intrínseca e extrínseca. A resistência intrínseca é uma capacidade natural que as bactérias possuem de evoluir geneticamente para suprimir o mecanismo de ação específico dos antibióticos.³ A resistência extrínseca ou adquirida ocorre por causa das respostas adaptativas da bactéria frente a exposição aos antibióticos, devido às alterações estruturais e/ou bioquímicas relacionadas a alterações genéticas cromossômicas ou extracromossômicas (plasmídios).³

A exposição frequente e contínua dos microrganismos aos antibióticos, geralmente relacionada com a automedicação, prescrição médica inadequada e uso exacerbado destas substâncias nas práticas agrícolas e pecuária (prevenção de doenças e promoção de crescimento rápido) intensificou este fenômeno.^{1,4}

Atualmente, a *Staphylococcus aureus* é uma das bactérias resistentes a múltiplos fármacos de maior relevância clínica. Ela é responsável pela maioria das infecções de pele e tecidos moles (p. ex. celulite, úlceras infectadas e feridas), bacteremia, abscessos, pneumonia, osteomielite, meningite, endocardite e sepse.⁵ Esta espécie Gram-positiva faz parte da microbiota de aproximadamente 20 a 40% da população, uma vez que é capaz de colonizar a mucosa nasal humana de forma assintomática.⁶ As infecções causadas pela *S. aureus* ocorrem quando as barreiras cutâneas e mucosas são rompidas como consequência de feridas, condições crônicas da pele ou intervenções cirúrgicas.^{5, 6}

As infecções causadas por *S. aureus* foram consideradas tratáveis com a introdução da penicilina, primeiro antibiótico introduzido na prática médica em 1941, porém o entusiasmo não durou muito, pois em 1953 houve os primeiros registros de surtos de *S. aureus* resistente à penicilina em ambiente hospitalar. Esta espécie também conseguiu desenvolver resistência a outros antibióticos introduzidos após o insucesso da penicilina, como metilicina, oxacilina e vancomicina.^{7, 8}

O preocupante panorama desencadeado pela resistência microbiana é ainda mais agravado pela diminuição significativa de investimento em pesquisas de novos agentes antimicrobianos pela indústria farmacêutica, tendo em vista que novas classes de antibióticos não são introduzidas no mercado há mais de 30 anos.⁴

A Organização Mundial da Saúde (OMS) publicou um relatório sobre a vigilância global da resistência microbiana aos antibióticos em 2014, alertando para o fato de que muito em breve a humanidade viverá uma “era pós-antibiótica” caso nenhuma ação coordenada e urgente for realizada em nível global.⁹ Em 2015, o relatório de O'Neill¹⁰ estimou que até 2050 o mundo atingirá a marca alarmante de 10 milhões de mortes anuais ocasionadas por infecções microbianas, com maior risco de mortalidade para os países emergentes, como o Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul.

A busca por tratamentos não-antibióticos para eliminar microrganismos resistentes deve ser considerada como altamente prioritária pela comunidade científica e estas abordagens devem ser capazes de superar a atual conjuntura da resistência microbiana sem fomentar novos mecanismos de resistência. Nesse sentido, pode-se destacar a terapia fotodinâmica e a hipertermia magnética, ambas consideradas promissoras como novas abordagens terapêuticas.

1.2 Terapia Fotodinâmica

1.2.1 Aspectos históricos

A utilização da luz para fins terapêuticos surgiu há milhares de anos em civilizações antigas da Índia, Egito e China. Há cerca de 4000 anos, os egípcios já combinavam banhos de sol e a utilização de plantas, que continham psoralenos, para o tratamento de doenças como o vitiligo.¹¹ Na história recente da medicina, a primeira menção bem-sucedida do uso de luz para o tratamento de doença foi feita por Niels Finsen no final do século XIX, quando usou a radiação luminosa para tratar um tipo de tuberculose cutânea chamada *Lupus vulgaris*. Por conta desta contribuição ele foi laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1903.¹²

A combinação de um agente fotossensibilizador e luz foi realizada pela primeira vez em 1900, quando o estudante de medicina Oscar Raab percebeu que a irradiação do *Paramecium caudatum* impregnado com o corante de acridina promovia a morte desse microrganismo. Mais tarde, Von Trappeiner, o professor de Oscar, realizou estudos com luz e o corante eosina para tratar lesões de câncer de pele.¹³ Em 1907 Von Trappeiner e

Jodlbauer demonstraram que o oxigênio também era um elemento imprescindível para alcançar os efeitos observados e assim cunharam o termo “ação fotodinâmica”.¹³ Houve outros trabalhos com resultados positivos, porém não despertaram interesse da comunidade científica na época, principalmente após a introdução dos antibióticos na década de 1940.^{13, 14}

Em meados do século XX, ocorreram avanços na descoberta e síntese de novos fotossensibilizadores porfirínicos. Na década de 1970, Thomas Dougherty utilizou um derivado de hematoporfirina em estudos clínicos pioneiros, nos quais 98% dos tumores tratados apresentaram redução com a terapia fotodinâmica.¹⁵ Isto provocou uma percepção muito positiva por parte da comunidade científica e impulsionou rapidamente a pesquisa para outros tipos de câncer, como o de cabeça, pescoço, pulmão e esôfago. Atualmente, a terapia fotodinâmica é aprovada pela agência federal de saúde e serviços humanos dos Estados Unidos (FDA, do inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento de alguns tipos de câncer, assim como em outros países.^{16, 17}

Os estudos da aplicação antimicrobiana da terapia fotodinâmica foram abandonados durante toda a “época de ouro” dos antibióticos, retornando apenas em 1990, devido ao enorme crescimento das infecções hospitalares provocadas por bactérias resistentes aos antibióticos.¹⁶

1.2.2 Aspectos gerais

A terapia fotodinâmica (PDT, do inglês *photodynamic therapy*) é uma abordagem terapêutica não-invasiva baseada em danos fotoinduzidos que envolve a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs), através da combinação simultânea de luz, oxigênio molecular e um agente fotossensibilizador (FS). Geralmente, os FSs utilizados na PDT possuem uma fluorescência apropriada que permite combinar a terapia com estratégias de imagem e monitoramento óptico, podendo assim realizar o diagnóstico e a avaliação do tratamento.^{18, 19}

Vários estudos pré-clínicos e clínicos indicam que a PDT é promissora para eliminar células cancerígenas e inativar microrganismos, e por isso pode ser utilizada no tratamento de câncer no pâncreas, próstata, bexiga, pescoço, pele e outros. Na odontologia é aplicada em casos de cárie, periodontite e peri-implantite. Além disso, doenças dermatológicas, doenças cardiovasculares e infecções bacterianas e fúngicas diversas,

também podem ser tratadas pela PDT.^{17, 20, 21} A PDT apresenta muitas vantagens quando comparada com tratamentos convencionais, as principais são:^{19, 22, 23, 24}

- A PDT possui uma dupla seletividade devido ao acúmulo preferencial das moléculas do FS nas células cancerígenas ou microbianas ao invés das células normais do hospedeiro e por conta da entrega localizada da luz;
- O tempo de tratamento é significativamente menor que os tratamentos convencionais;
- As EROs, responsáveis pelo dano celular na PDT, possuem uma alta reatividade com moléculas biológicas. Estas espécies, por serem instáveis e agirem de maneira inespecífica, possuem uma multiplicidade de alvos, o que dificulta o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelo microrganismo;
- O modo de ação inespecífico da PDT permite que ela seja utilizada para inativar um amplo espectro de microrganismos patogênicos independente do perfil de resistência. Além disso, em contraste com os antibióticos, também pode ser usada no tratamento de infecções mistas, isto é, infecções que envolvem bactérias de espécies diferentes e até mesmo combinações com outros microrganismos;

A PDT também apresenta algumas desvantagens, como a cessão do efeito antimicrobiano com o fim da irradiação luminosa, eficiência limitada pela baixa penetração tecidual da luz e possíveis efeitos colaterais, como a fotossensibilidade prolongada da pele e dos olhos após as sessões da terapia.^{16, 20, 23}

A eficiência da PDT está relacionada a um conjunto de fatores, tais como as propriedades químicas e fotoquímicas do FS, natureza das interações do FS com as moléculas biológicas e, conseqüentemente, com as estruturas biológicas, dosagem e entrega do FS nas células alvo, tempo entre a administração do FS e a irradiação, comprimento de onda da luz utilizada e o nível de oxigenação dos tecidos.^{19, 25, 26}

1.2.3 Fotossensibilizador

O fotossensibilizador tem uma importância central na terapia fotodinâmica, porque o sucesso do procedimento terapêutico depende da escolha adequada deste. Os FSs ideais devem atender aos seguintes requisitos:^{12, 22, 24}

- A irradiação do FS com luz na região espectral adequada, isto é, na região em que o FS possui um máximo de absorção no UV-vis deve resultar na produção de EROs;
- Na ausência de luz o FS deve ser inerte (sem toxicidade no escuro), principalmente para as células de mamíferos. Além disso, eles não podem ocasionar efeitos secundários (p. ex. mutagênicos, carcinogênicos ou alérgicos);
- A absorvidade molar do FS deve ser relativamente alta ($> 2 \text{ a } 3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), pois isso minimiza a dose de FS necessária para alcançar o efeito desejado;
- Devem absorver a luz na região visível do espectro e preferencialmente no vermelho, com comprimentos de onda (λ) situados entre 600 a 800 nm, pois a luz com λ na faixa de 800 a 1000 nm tem baixa energia, podendo ser insuficiente para promover a excitação eletrônica do FS. A luz com $\lambda > 1000$ nm pode ocasionar efeitos fototérmicos, porque nessa região ela estimula vibrações moleculares e sua energia é absorvida por moléculas de água. Para $\lambda < 625$ nm a luz penetra menos nos tecidos devido ao seu espalhamento e absorção por cromóforos naturais presente nos tecidos, como melanina e hemoglobina. Além disso, sua maior energia pode causar fotossensibilidade na parte do corpo que foi irradiada. Este intervalo ótimo para a absorção do FS é muito importante em casos de lesões profundas, mas para lesões superficiais a penetração tecidual da luz torna-se pouco relevante;
- A eliminação farmacocinética do FS no corpo do paciente deve ser rápida (< 1 dia após a administração), a fim de evitar a necessidade de proteção pós-tratamento contra exposição à luz e fotossensibilidade prolongada da pele;
- O FS deve ser um composto puro, estável em meios aquosos e biológicos e solúvel em água;

Atualmente, existem muitos compostos naturais e sintéticos conhecidos que podem agir como FS, sendo a maioria compostos aromáticos com elétrons π deslocalizados. Eles podem ser classificados em duas grandes classes: porfirínicos e não-porfirínicos (Figura 1). Os FSs porfirínicos apresentam um macrociclo tetrapirrólico cujos grupos pirrólicos estão ligados por unidades $=\text{(CH)-}$ ou $-\text{CH}_2-$, como por exemplo a verteporfina (BPD-MA), meta-tetrahidroxifenilclorina, (mTHPC ou Foscan) e a clorina e6. A classe de FSs não-porfirínicos incluem moléculas com estruturas químicas mais diversificadas, tais

como os fulerenos funcionalizados, xantenos (p. ex. rosa bengala), corantes fenotiazínicos (p. ex. azul de metileno e azul de orto-toluidina), curcumina e hipericina.^{22, 27}

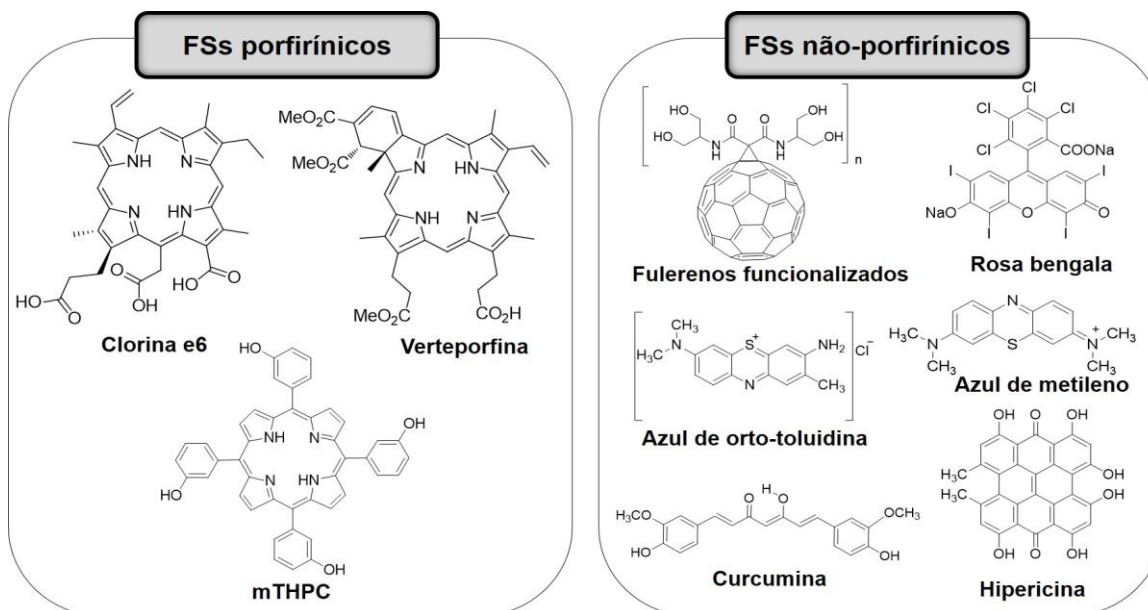


Figura 1: Estruturas de alguns fotossensibilizadores porfirínicos (esquerda) e não-porfirínicos (direita). Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

1.2.3.1 Mecanismo fotofísico e fotoquímico da geração de EROs

Os processos fotofísicos envolvidos na formação das EROs se iniciam com a absorção da luz pelo FS (Figura 2). Inicialmente, o FS está no estado de energia fundamental (S_0), no qual os elétrons estão emparelhados com spins opostos, o que configura o estado singleto, e todos ocupam orbitais moleculares de mais baixa energia. Quando o FS no seu estado fundamental singleto (1FS_0) absorve um quantum de energia proveniente da radiação luminosa num comprimento de onda apropriado ocorre a promoção do elétron para um orbital desocupado de maior energia, indo assim para um estado excitado singleto (S_n). Neste estado o FS pode retornar rapidamente para o S_0 , energeticamente preferível, através de vários processos.^{19, 24, 28}

O FS no estado excitado ($^1FS_{ex}$) decai para um estado excitado de mais baixa energia (S_1). O estado excitado possui subníveis de energia, estados vibracionais. O $^1FS_{ex}$ pode ir para um subnível de energia mais baixo através de um processo chamado de relaxamento vibracional, dissipando energia na forma de calor.²⁸ Neste subnível o $^1FS_{ex}$ pode perder energia, emitindo fluorescência ou por dissipação de calor. Além disso, também pode ocorrer o cruzamento intersistema (CSI), no qual o FS passa para um estado excitado tripleto (T_1) com a mesma energia. O FS neste estado, $^3FS_{ex}$, possui uma

configuração eletrônica com dois elétrons desemparelhados e orientações de spin iguais.^{19, 28}

No estado tripleto, também pode ocorrer relaxamentos vibracionais e o FS passa para um subnível vibracional de mais baixa energia. A partir deste subnível, ele pode ir para o nível S_0 através de um processo radiativo chamado de fosforescência. A vida útil do T_1 é longa, permitindo que reações fotoquímicas envolvendo $^3FS_{ex}$ compitam com a fosforescência.^{24, 28} Estas reações fotoquímicas podem ser denominadas do tipo I ou tipo II dependendo da natureza da interação entre o $^3FS_{ex}$ e as moléculas vizinhas. Estas reações podem ocorrer simultaneamente, e a razão entre elas depende principalmente da natureza do FS, o ambiente celular e os níveis de oxigênio no local de ação.^{24, 29}

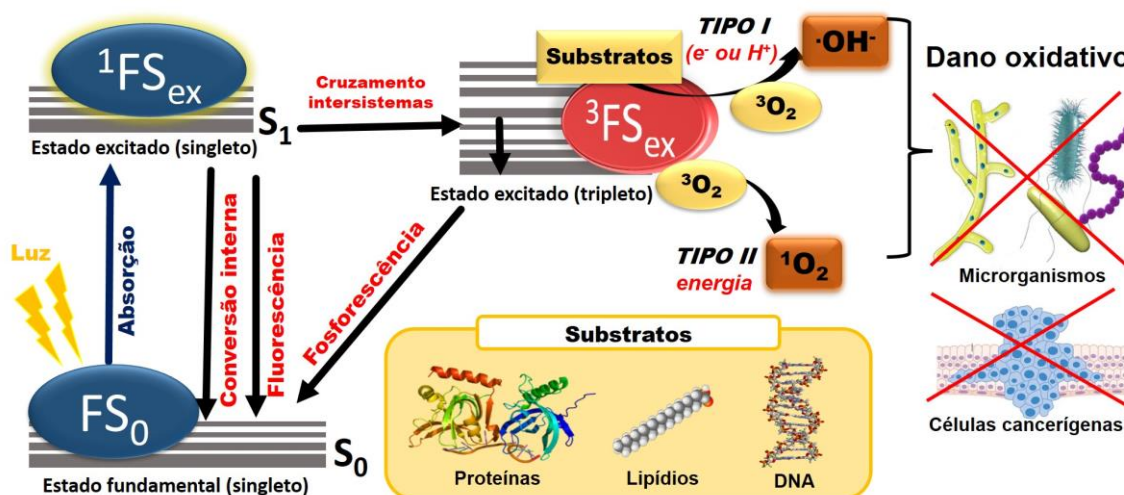


Figura 2: Representação dos processos fotoquímicos e fotoquímicos envolvidos na geração de EROs pelo fotossensibilizador. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Nas reações fotoquímicas do tipo I, ocorre transferência de elétrons ou prótons do $^3FS_{ex}$ para o oxigênio ou outras moléculas vizinhas. As moléculas do FS no estado tripleto podem fazer esta transferência entre si ou com outras moléculas, formando radicais aniônicos e catiônicos, que por sua vez podem reagir com o oxigênio no estado fundamental tripleto (3O_2) para formar o ânion radical superóxido ($\cdot O_2^-$).²⁹ Este radical, por ser pouco reativo em sistemas biológicos, podem reagir entre si para formar o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) numa reação catalisada pela enzima superóxido dismutase (SOD).¹⁹ Posteriormente, pode ocorrer uma reação do tipo fenton, na qual o superóxido reage com o H_2O_2 por meio da ação catalítica dos cátions Fe^{3+} para formar o radical hidroxilo ($HO\cdot$).²⁴ O radical hidroxilo é muito reativo e consegue reagir com moléculas orgânicas para formar outros radicais, tais como peroxila e alcoxila.

As reações fotoquímicas do tipo II são caracterizadas pela transferência de energia entre o FS no estado excitado tripleto e o oxigênio no estado fundamental para forma o oxigênio singleto no estado excitado ($^1\text{O}_2$).²⁹ Esta espécie é altamente reativa e devido ao seu orbital desocupado pode reagir com compostos insaturados, como os lipídeos. O oxigênio singleto também pode reagir com compostos contendo nitrogênio e enxofre, como alguns aminoácidos (triptofano, tirosina, histidina, metionina, cisteína e cistina).¹⁹ O oxigênio singleto, radical hidroxila e o radical superóxido são as principais espécies reativas de oxigênio (EROs) geradas nas reações fotoquímicas envolvendo os FSs quando irradiados com a luz. Estas espécies reagem com moléculas biológicas e, por conseguinte, causam um alto estresse oxidativo para as células cancerígenas e de microrganismos patogênicos.¹⁹

A molécula do fotossensibilizador, após os processos fotofísicos e fotoquímicos que seguem a absorção do quantum de energia, retorna ao seu estado de energia fundamental, e então pode absorver novamente energia da luz e reiniciar o ciclo. Porém, isto não ocorre indefinidamente, porque o FS pode sofrer transformações e perder a capacidade de participar da reação fotodinâmica. Este efeito é chamado fotobranqueamento (do inglês, *photobleaching*).²⁸

1.2.4 Ação fotodinâmica antimicrobiana

Quando a terapia fotodinâmica é utilizada para inativar microrganismos é comumente chamada de terapia fotodinâmica antimicrobiana (aPDT, do inglês *antimicrobial photodynamic therapy*) ou inativação fotodinâmica (“PDI, do inglês *photodynamic inactivation*). Neste trabalho foi adotado a primeira nomenclatura.

Em aplicações clínicas, inicialmente o FS é administrado ao paciente, de maneira sistêmica ou tópica, seguida de um tempo de sensibilização necessário para que ocorra o acúmulo do FS na região desejada e por fim, a irradiação com uma fonte de luz apropriada (Figura 3).

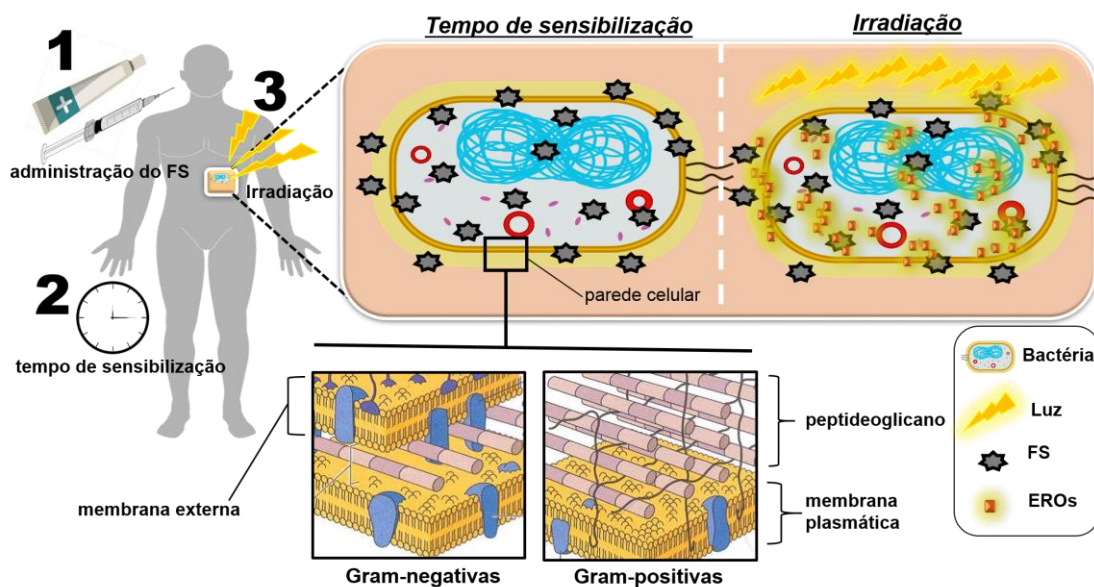


Figura 3: Representação das etapas do tratamento da terapia fotodinâmica e da ação localizada da geração de EROs em células bacterianas. Fonte: adaptado de Tortora, Funke e Case.⁶

Durante o tempo de sensibilização os FSs, principalmente os catiônicos, tendem a se acumular preferencialmente nas células microbianas do que nas células de mamífero, devido à carga negativa mais pronunciada das células microbianas e porque a absorção do FS por essas células é mais rápida. Estes dois fatos estão relacionados com as diferenças estruturais das células microbianas e configuram a seletividade do FS na aPDT.²³

A suscetibilidade das bactérias ao aPDT é fortemente afetada pela característica da parede celular.²⁶ De acordo com a estrutura da parede as bactérias são classificadas em Gram-positivas e Gram-negativas.⁶ A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta por uma rede macromolecular espessa e porosa de peptidoglicano, que é formada por unidades repetitivas de dissacarídeos e porções polipeptídicas.⁶ Enquanto, que a parede celular nas bactérias Gram-negativas é composta por uma fina camada de peptidoglicano e uma membrana externa formada por lipopolissacarídeos.⁶ A presença desta membrana externa dificulta a penetração do FS na parede celular das bactérias comprometendo a eficiência da aPDT. Portanto, as bactérias Gram-positivas são, geralmente, mais suscetíveis ao aPDT do que as bactérias Gram-negativas.²⁶

A distribuição do FS na região intracelular e intercelular das células microbianas também é importante para o resultado da aPDT, pois a ação das EROs produzidas no momento da irradiação ocorre na região onde o FS se encontra. Esta ação localizada se

deve à alta reatividade das EROs produzidas. O oxigênio singlete, por exemplo, tem um tempo de vida menor que 0,04 μ s em sistemas biológicos e, por isso, tem uma capacidade de difusão muito pequena.^{19, 24}

O estresse oxidativo fotoinduzido causa modificações morfológicas (p. ex. alteração da estrutura do mesossomo) e alterações funcionais, como a perda de atividades enzimáticas, oxidação de proteínas e inibição de processos metabólicos.¹⁹ Quando o FS atua preferencialmente na membrana celular, o dano causado pode levar à lise celular após a inativação do sistema de transporte da membrana.³⁰

As bactérias possuem mecanismos de defesa contra algumas EROs através da regulação e expressão de enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, a glutatona peroxidase e a catalase. No entanto, estes mecanismos são insuficientes diante da proporção do estresse oxidativo fotoinduzido, uma vez que as EROs são geradas em altas quantidades e rapidamente. Além disso, como já foi mencionado, a aPDT é um processo que prejudica múltiplos alvos celulares, diferente da ação antimicrobiana dos antibióticos, que agem muito especificamente num alvo definido. A alta produção de EROs associada ao seu modo de ação inespecífico torna pouco provável o desenvolvimento de resistência bacteriana contra o estresse oxidativo promovido pelo aPDT.^{31, 32}

1.3 Curcumina

A curcumina é um corante natural extraído dos rizomas da planta cúrcuma ou açafrão-da-índia (*Curcuma longa*). O pó amarelo-alaranjado obtido nesta extração possui uma mistura de curcuminóides: a curcumina (CUR), que está em maior proporção, desmetoxicurcumina (DMCur), bisdesmetoxicurcumina (BDMCur) e a ciclocurcumina (CCur). Estes curcuminóides podem corresponder a 2-9% do peso seco da cúrcuma, dependendo do solo e da região de cultivo.^{33, 34} As estruturas químicas destes curcuminóides estão apresentadas na Figura 4.

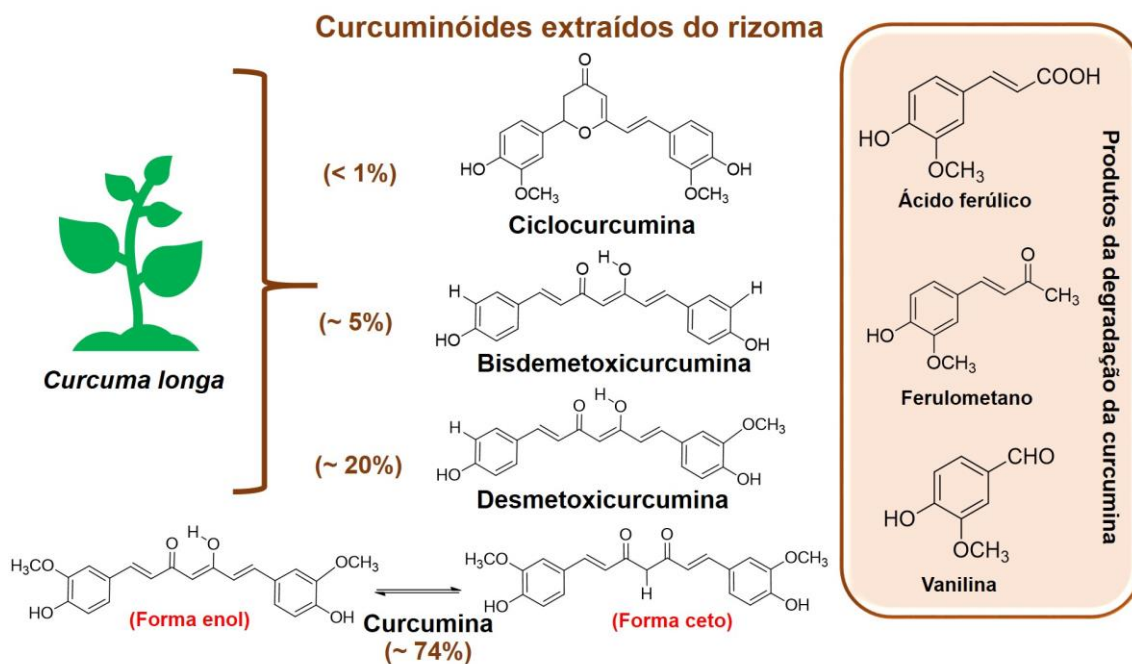


Figura 4: Estruturas químicas dos principais curcuminóides presentes no pó amarelo extraído dos rizomas da planta *curcuma longa*. No lado direito estão representadas as estruturas dos principais produtos de degradação da curcumina em meio aquoso. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Usada há milênios, a curcumina foi isolada da cúrcuma no início do século XIX, no entanto, só ganhou notoriedade na comunidade científica a partir de 1990, quando demonstrou-se que ela tinha um potencial efeito anticancerígeno.³³ Atualmente, sabe-se que a curcumina pode exercer diversas atividades farmacológicas, tais como anticancerígena, antimicrobiana, anti-inflamatória, antioxidantes e efeito antiviral contra a hepatite B e H1N1.^{35, 36} Além disso, ela pode atuar na cicatrização de feridas e contra doenças crônicas como diabetes e doença de Alzheimer. Além deste amplo espectro de atividades, a curcumina apresenta um ótimo perfil de segurança farmacológica.^{34, 37} Porém, a atividade terapêutica da curcumina é dificultada pela sua baixa absorção, metabolismo rápido e uma rápida eliminação sistêmica. Esta baixa biodisponibilidade, apenas 1% da dose inicial administrada em humanos, está associada à sua baixa solubilidade em água (~ 400 ng.mL⁻¹ a pH 7,4).³⁸

A Curcumina, nomenclatura IUPAC (1E,6E)-1,7-bis(4-hidroxi-3-metoxifenil)-1,6-heptadieno-3,5-diona, possui uma estrutura química simétrica formada por dois sistemas de anéis aromáticos contendo grupos o-metoxifenólicos ligados às duas extremidades de uma cadeia β -dicetona α,β -insaturada.³⁴ A curcumina exibe tautomerismo ceto-enol que depende da polaridade e do pH do meio. Em solventes não polares é encontrada na forma enol, por causa da formação de ligação de hidrogênio intramolecular e esse tautômero

também prevalece em meios aquosos com pH acima de 8. Já a forma diceto prevalece em solventes polares e em meios ácidos ou neutros.^{33, 37}

Em solução aquosa, a estabilidade da curcumina é dependente do pH. Ela possui uma maior estabilidade na faixa de pH 1 a 6. Estudos indicam que a degradação da curcumina é catalisada por íons hidróxidos (OH^-) presente no meio, como em pH inferiores a 6 a quantidade de OH^- é baixa, a degradação ocorre mais lentamente.³⁹ Em condições fisiológicas mimetizadas (solução tampão fosfato 0,1 M, 37 °C, pH 7,2) a curcumina tem 90% de degradação em 30 min.⁴⁰ Os produtos desta degradação são vanilina, ácido ferúlico e outros fenóis pequenos (Figura 4). Quando exposta à luz, a fotodegradação também gera estes produtos, porém ocorre mais rápido e envolvem EROs formadas na fotoexcitação.^{39, 40}

A estrutura química da curcumina possui uma elevada deslocalização de elétrons devido à conectividade dos dois anéis aromáticos por uma cadeia insaturada com ligações duplas alternadas. Isto permite absorção de luz na região espectral do azul, mais especificamente em 420-450 nm, dando à solução de curcumina uma coloração amarela.³⁹ A absorção da curcumina na região do visível é fortemente influenciada pelo pH e o meio de dispersão.³⁹ Devido a esta absorção na região espectral do visível e à sua capacidade de gerar EROs quando irradiada com luz azul, a curcumina vem sendo utilizada como um FS pertinente para a aPDT em tratamentos tópicos.^{41, 42}

Em contrapartida, a curcumina também apresenta atividade antioxidante, isto é, consegue eliminar radicais como o ânion superóxido e radical hidroxila, evitando assim danos às moléculas biológicas. Estes radicais podem reagir com os grupos OH fenólicos e a porção enólica por abstração de hidrogênio ou transferência de elétrons.⁴³ Isto pode parecer contraditório, mas este comportamento antagônico só ocorre quando a curcumina está exposta a condições diferentes. Portanto, ao invés de contraditoriedade, isto reforça a versatilidade terapêutica da curcumina: quando irradiada com luz azul, promove a terapia fotodinâmica; e na ausência de irradiação luminosa, atua como antioxidante.

1.4 Nanomateriais em Terapia Fotodinâmica

Um dos principais desafios a ser superado na terapia fotodinâmica é a administração do fotossensibilizador ao tecido alvo. A maioria dos FSs, devido sua elevada hidrofobicidade, formam agregados em meios aquosos, e isso afeta suas propriedades fotofísicas, químicas e biológicas, diminuindo assim, a sua biodisponibilidade e a ação

fotodinâmica.²² Uma alternativa promissora para superar o problema da agregação dos FSs e melhorar a sua biodisponibilidade na forma monomérica é combiná-los com nanomateriais. O uso dos nanomateriais pode melhorar a eficiência da terapia fotodinâmica, não apenas por superar os inconvenientes associados a estabilidade dos FSs, mas também por direcionar os FSs ao tecido alvo e assim aumentar o acúmulo seletivo na região. Isto também diminui os efeitos colaterais da fotossensibilidade pós-tratamento no caso de administrações sistêmicas.^{44, 45}

Os FSs podem ser encapsulados ou imobilizados nos nanomateriais por interações covalentes e não-covalentes em lipossomas, nanoemulsões, nanopartículas poliméricas, nanopartículas de sílica, carbono, pontos quânticos e metálica (p. ex. ouro e prata) ou de óxidos de metais (p. ex. dióxido de titânio, óxido de zinco e óxido de ferro).^{44, 46, 47}

As nanopartículas de óxido de ferro (IONPs, do inglês *iron oxide nanoparticles*), por exemplo, apresentam características que as tornam extensamente aplicáveis como nanocarreadores, agentes de imagem por ressonância magnética e agentes terapêuticos (antimicrobianos e hipertermia magnética).⁴⁸ Logo, a associação de FSs com IONPs permite aliar as suas características fotoquímicas e fotofísicas com as propriedades magnéticas desses materiais, possibilitando a combinação da PDT com a liberação controlada do FS, direcionamento do FS ao tecido alvo através de um campo magnético estático e/ou mediado por moléculas biológicas ligadas às IONPs, hipertermia magnética, dentre outros benefícios.^{49, 50}

Muitos trabalhos exploraram a conjugação IONP-FS na eficiência da PDT.^{51, 52, 53,}
⁵⁴ Huang *et al.* (2011) conjugaram IONPs, diâmetro de ~ 20 nm, com o FS clorina e6 (Ce6) através de um agente acoplador silano. Os conjugados em baixas concentrações conseguiram reduzir 80% da viabilidade de células do câncer gástrico quando irradiados em 633 nm numa irradiância de 30 mW.cm⁻².⁵¹

Em outro estudo, Matlou *et al.* (2018) apontaram que os conjugados de IONPs e derivados de ftalocianina de zinco com acoplamento do ácido fólico apresentaram rendimentos quânticos de oxigênio singleto menores em comparação com os derivados livres. Além disso, os autores relataram que a toxicidade destes conjugados em ensaios de PDT também foi menor.⁵² Por outro lado, Penon *et al.* ⁵³ (2016) descreveram a síntese de IONPs associadas com diferentes porfirinas e relataram um aumento considerável na produção de oxigênio singleto quando comparado com os níveis produzidos pelas porfirinas livres. Mbakidi *et al.* (2013) também demonstraram que a conjugação de

clorina poliaminada p6 com IONPs resultou numa toxicidade maior, em ensaios de PDT, contra linhagens celulares de melanoma em comparação com o FS sozinho.⁵⁴

1.5 Nanopartículas de Óxido de Ferro Superparamagnéticas (SPIONPs)

As IONPs são uma das classes de nanopartículas inorgânicas mais amplamente estudadas devido sua versatilidade de aplicações industriais, ambientais, analíticas e biomédicas. Esta versatilidade é decorrente de suas propriedades catalíticas, elevada estabilidade química e física, comportamento magnético, baixo custo e compatibilidade biológica.^{55, 56, 57}

Dentre os óxidos de ferro se destacam a magnetita (Fe_3O_4) e a maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$). A magnetita apresenta uma estrutura cristalina cúbica do tipo espinélio invertida, formada por um conjunto de íons O^{2-} posicionados nos vértices, enquanto que todos os íons Fe^{2+} ocupam metade dos interstícios octaédricos e os Fe^{3+} ocupam igualmente interstícios octaédricos e tetraédricos.^{58, 59} A maghemita apresenta uma estrutura cristalina muito similar à magnetita, sendo que a principal diferença reside no fato de que na maghemita há apenas cátions Fe^{3+} e a presença de vacâncias nos interstícios octaédricos devido à ausência de Fe^{2+} na estrutura.^{58, 59} Portanto, a maghemita pode ser considerada como a forma totalmente oxidada da magnetita. Na Figura 5 estão representadas as estruturas cristalinas destes óxidos.

O magnetismo destes óxidos está relacionado com a distribuição dos cátions nos interstícios da estrutura.⁶⁰ No caso da maghemita, a célula unitária é composta por 16 interstícios octaédricos que são ocupados por 13,33 Fe^{3+} e 2,66 vacâncias e 8 interstícios tetraédricos ocupados apenas por Fe^{3+} .⁵⁹ Os 8 íons dos interstícios tetraédricos e 8 íons daqueles que ocupam os interstícios octaédricos não geram momento magnético resultante, devido ao cancelamento dos seus momentos magnéticos.⁶⁰ Logo o magnetismo da maghemita é proveniente dos 5,33 Fe^{3+} presentes nos interstícios octaédricos.

A maghemita e magnetita, em temperatura ambiente, apresentam comportamento ferrimagnético, isto é, são materiais que apresentam magnetização permanente mesmo na ausência de um campo magnético externo e quando estão na presença do campo possuem altos valores de susceptibilidade magnética.^{61, 62}

Os óxidos de ferro apresentam forte dependência do comportamento magnético com o tamanho das nanopartículas, por exemplo, quando a maghemita passa de sólido

estendido (sólido "bulk") para nanopartículas, ela deixa de ser ferrimagnética e passa a ser superparamagnética (Figura 5).⁶⁰

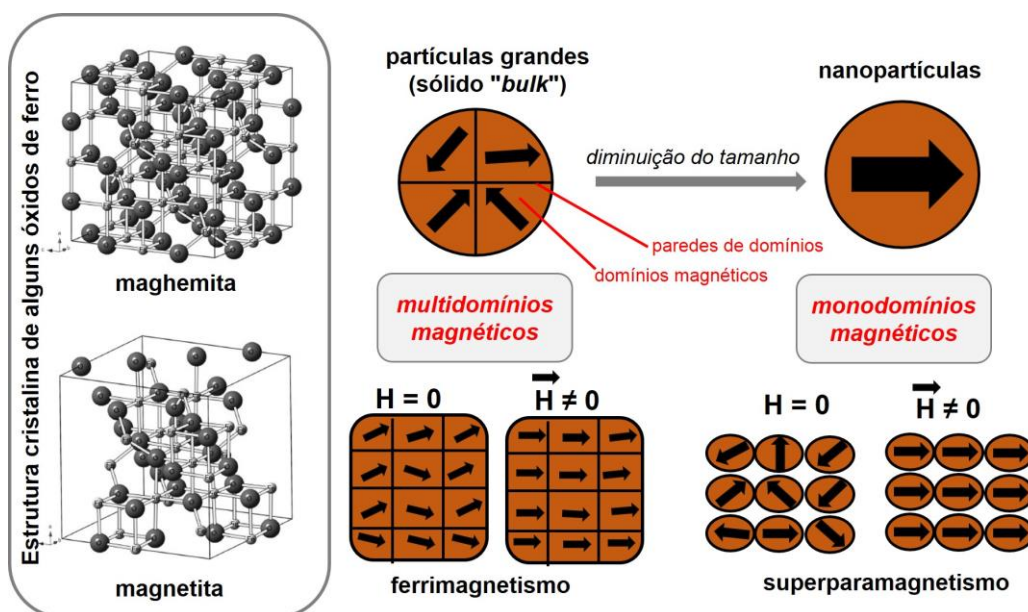


Figura 5: Representação da estrutura cristalina da magnetita e maghemita (esquerda) e o esquema da mudança no magnetismo nos nanomateriais (direita). Fonte: adaptado de Oliveira, Fabris e Pereira.⁵⁹

As nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro (SPIONPs, do inglês *superparamagnetic iron oxide nanoparticles*), em termos práticos, apresentam uma susceptibilidade magnética alta na presença de um campo magnético externo e magnetização nula quando o campo é removido.⁶⁰ Este comportamento magnético ocorre quando o tamanho das IONPs está abaixo de um valor crítico, geralmente entre 10 a 20 nm dependendo do material e quando a temperatura está acima da chamada temperatura de bloqueio, que é a temperatura na qual os momentos magnéticos das partículas não conseguem se reorientar na presença de um campo magnético. Diz-se, portanto, que esses momentos estão bloqueados.^{61, 63}

De forma simplória, pode-se considerar que os momentos de dipolo magnéticos nos materiais volumétricos estão organizados em regiões de pequeno volume delimitados por paredes, denominado domínios magnéticos. Porém, quando as partículas do material magnético passam para a escala nanométrica, abaixo do tamanho crítico, a presença de multidomínios torna-se energeticamente desfavorável e os dipolos magnéticos se organizam em um único domínio.^{60, 64}

A análise da curva de magnetização de um material em função do campo magnético aplicado permite diferenciar o seu comportamento ferromagnético do superparamagnético (Figura 6).⁶⁴ Quando um campo magnético é aplicado, em uma única direção, num material ferrimagnético, ocorre a movimentação das paredes dos domínios magnéticos. Os domínios magnéticos mais alinhados com o campo sofrem aumento de tamanho e a magnetização do sistema também aumenta. O aumento do campo provoca o crescimento dos domínios maiores em detrimento da diminuição dos menores, até um ponto em que o sistema atinge a configuração de monodomínio, na qual a magnetização tem um valor máximo. Este ponto máximo é denominado magnetização de saturação (M_s). A remoção do campo aplicado não faz o sistema retornar para um estado de magnetização nula. Isto se deve a existência de paredes entre os domínios, que dificulta a relaxação da magnetização e por consequência, quando o campo for nulo o sistema mantém uma magnetização remanescente (M_r). A aplicação de um campo magnético crescente no sentido oposto é necessária para diminuir a magnetização remanescente, atingindo uma magnetização nula quando o valor do campo atinge um determinado valor, denominado campo magnético coercivo (H_c). O aumento da intensidade do campo magnético no mesmo sentido leva ao ponto de saturação magnética nesse sentido. O aumento da intensidade de campo no sentido contrário, leva o sistema de uma extremidade de saturação a outra, completando assim um ciclo, que é conhecido como ciclo de histerese, que é uma curva típica dos materiais ferrimagnéticos.

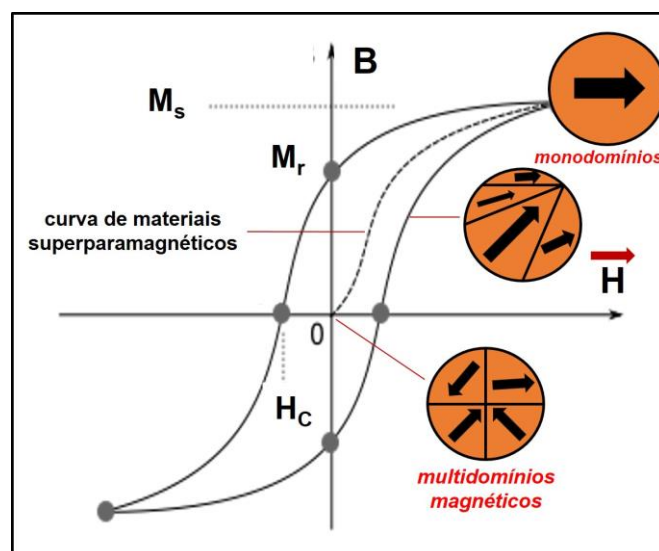


Figura 6: Curva de magnetização de materiais ferrimagnéticos e superparamagnéticos. Fonte: adaptado de Callister.⁶⁴

No caso das SPIONPs, a curva de magnetização em função do campo não possui histerese e apresenta um formato sigmoide, uma vez que estas nanopartículas apresentam monodomínios magnéticos cujos momentos se alinham na direção do campo aplicado e ao remover o campo a magnetização torna-se nula, logo não há campo coercivo e magnetização remanescente.^{60, 64}

Dentro da escala nanométrica, as propriedades magnéticas das partículas são determinadas por fatores como, características geométricas (tamanho, forma e distribuição de tamanho), interações magnéticas intra e interpartículas.^{55, 63, 65, 66, 67}

1.5.1 Síntese das SPIONPs

As SPIONPs podem ser sintetizadas por meio de uma variedade de metodologias, tais como: coprecipitação, microemulsão, métodos eletroquímicos, reações sonoquímicas e reações hidrotermais.^{68, 63, 55} O método de síntese tem influência na morfologia das nanopartículas, podendo-se prepará-las na forma de poliedros, flocos, esferas, cubos, nanofios, entre outros.^{68, 69} Além disso, o método de síntese afeta a distribuição de cátions na estrutura, pureza e tamanho médio das partículas e, portanto, as propriedades magnéticas das nanopartículas.^{63, 69}

O método de coprecipitação é a via química mais utilizada para obtenção de magnetita e maghemita.⁶⁸ A síntese destas nanopartículas consiste na coprecipitação de sais férricos e ferrosos em meios alcalinos à temperatura ambiente ou mais elevada. As vantagens desta abordagem são: simplicidade do aparato de síntese, baixo custo, rendimento elevado e fácil projeção de síntese para a escala industrial.^{63, 68} No entanto, o tamanho e a distribuição de tamanho (polidispersão) são fatores limitantes, uma vez que o crescimento de cristais é controlado por fatores cinéticos.^{63, 55}

O método de Massart é a metodologia de coprecipitação mais comum e considerada a mais econômica.⁶³ Neste método, a magnetita é obtida por uma mistura estequiométrica 2:1 ($\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) em meio alcalino.^{70, 71, 72} Através deste método pode-se obter nanopartículas de magnetita com tamanhos entre 2 a 20 nm.⁶³ Posteriormente, a magnetita pode ser oxidada a maghemita em meio ácido.⁷² Nesta síntese, as nanopartículas são obtidas na forma de ferrofluido estável, no qual estão estabilizadas pela repulsão eletrostática através do controle da densidade de cargas na superfície por meio do ajuste do pH do meio de dispersão.^{70, 71}

1.5.2 Aplicações biomédicas das SPIONPs

As propriedades das SPIONPs, especialmente o seu comportamento superparamagnético, oferecem muitas possibilidades de aplicação no campo biomédico, tais como agentes de contraste de imagem por ressonância magnética, hipertermia magnética em células tumorais e células microbianas, biossensores, nanocarreadores para entrega de fármacos e mais recentemente, como agente antimicrobiano.^{48, 62, 72, 73}

As SPIONPs possuem alta susceptibilidade à campos magnéticos e por isso, podem ser direcionadas a um local específico do corpo, como órgão, tecido infectado ou tumor por meio do gradiente produzido pelo campo. Isto, porém, só é permitido porque o campo magnético apresenta uma boa penetrabilidade nos tecidos humanos.^{48, 74} Esta possibilidade de direcionamento através de um magneto externo torna as SPIONPs ótimos candidatos para serem nanocarreadores em liberação controlada de fármacos.^{74, 75} Estes sistemas de liberação otimizam a dose do fármaco transportado, uma vez que reduz a sua biodegradação e distribuição sistêmica, além de aumentar a absorção e o acúmulo na região de interesse.⁷⁴

O comportamento superparamagnético torna ainda mais valiosa a aplicação de SPIONPs na medicina, devido ao fato destas nanopartículas gerarem calor localmente quando são submetidas a um campo magnético alternado. Este comportamento é o fundamento da hipertermia magnética.^{76, 77} O calor gerado desta forma, também pode ser usado para controlar remotamente a liberação de fármacos em nanocarreadores baseados em SPIONPs, uma vez que a elevação de temperatura local pode ocasionar mudanças estruturais no sistema de liberação.^{78, 79}

1.6 Hipertermia Magnética

A hipertermia é um procedimento terapêutico que promove aumento da temperatura dos tecidos, entre 42-44 °C, usando métodos físicos, como micro-ondas, radiofrequência, laser e ultrassom, mas a dificuldade do controle da temperatura limita o uso desses métodos na aplicação clínica da hipertermia, particularmente em regiões anatômicas profundas.⁸⁰ A hipertermia magnética (HM) ou magnetohipertermia (MHT) oferece uma solução atraente para este problema.⁸¹

Na HM, o ferrofluido de SPIONPs pode ser injetado localmente no corpo do paciente ou pode ser conduzido e acumulado na região de interesse através de um campo magnético externo estático, isto é, conduzido por um ímã. Depois de um intervalo, para

promover a internalização ou associação das IONPs nas células alvo, aplica-se um campo magnético externo de frequência alternada (CMA). O resultado disto é a dissipação de energia na forma de calor, que promove a elevação local da temperatura (Figura 7).^{82, 83}

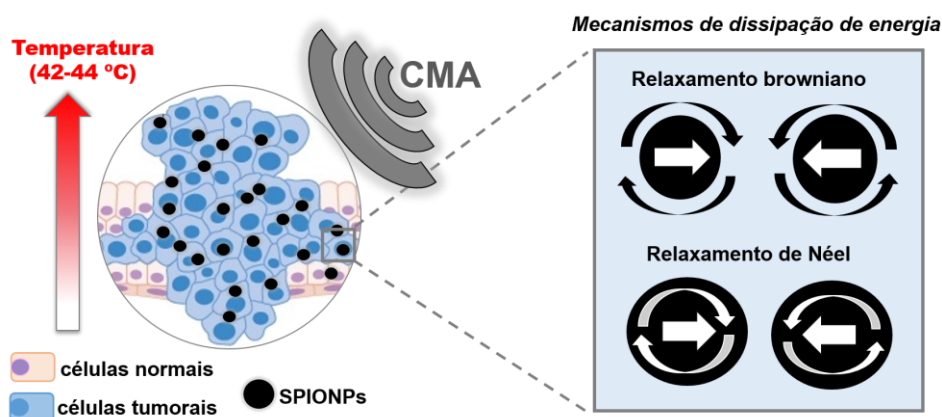


Figura 7: Representação do uso de SPIONPs sob um campo magnético externo de frequência alternada (CMA) para promover HM em células cancerígenas. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

O uso de materiais magnéticos para promover hipertermia foi realizado pela primeira vez por Gilchrist *et al.*, em 1957, que injetaram em um tecido tumoral IONPs de maghemita com tamanho entre 20 a 100 nm e após aplicação de um campo magnético de 1,2 MHz, observou que a elevação de temperatura do tecido para 46 °C promoveu o desaparecimento do carcinoma.⁸³ Desde a publicação deste estudo até os dias atuais, a HM conseguiu grandes avanços principalmente nos estudos clínicos, impulsionado pelo desenvolvimento da nanotecnologia de materiais magnéticos.^{76, 81, 83}

Os estudos clínicos de HM têm conseguido bons resultados no tratamento de cânceres de próstata, esôfago, cerebral, cervical, dentre outros.^{83, 84, 85} Este procedimento, não-invasivo, é uma alternativa terapêutica para o câncer sem os efeitos colaterais associados às terapias convencionais, como cirurgia, quimioterapia e radioterapia.⁸⁵ Atualmente, a maioria dos estudos clínicos da HM concentra-se na Alemanha, Japão e China.⁸³

A aplicação da HM em tratamentos oncológicos baseia-se no fato das células cancerígenas serem mais sensíveis à elevação de temperatura que as saudáveis. Os tecidos tumorais possuem fluxo sanguíneo deficiente devido à baixa vascularização dessas regiões, o que provoca superaquecimento das células cancerígenas, enquanto que nos tecidos saudáveis o superaquecimento é evitado pela organização do fluxo sanguíneo na região tecidual.^{86, 85}

Atualmente, a HM vem sendo proposta também para inativar microrganismos, principalmente bactérias. Nas células microbianas a elevação da temperatura pode promover a destruição da parede celular e a inativação de moléculas biológicas, desencadeando, respectivamente, vazamento do conteúdo celular e interferência nos processos biológicos sinalizados por essas moléculas.^{87, 88}

1.6.1 Mecanismos de dissipação de calor das SPIONPs

Nos materiais ferrimagnéticos os momentos magnéticos estão orientados em uma direção preferencial, que está associada as interações spin-orbital entre átomos vizinhos e a ocorrência de simetria na rede cristalina, o que por sua vez origina a anisotropia magnetocristalina.⁶⁰ Como já mencionado, em partículas muito pequenas, como as SPIONPs, os momentos magnéticos estão organizados em domínios únicos, e sua energia de anisotropia pode se converter em energia térmica, ocasionado livre rotação do momento magnético. Isto leva a uma magnetização resultante nula das nanopartículas na ausência de um campo magnético externo.⁶⁰

A aplicação de um CMA pode causar inversão na orientação destes momentos magnéticos e o seu relaxamento de volta ao equilíbrio libera energia térmica, resultando em aquecimento local (Figura 7).^{76, 89, 90} Se durante o relaxamento do momento magnético a orientação da partícula permanecer fixa, a dissipação de energia dar-se por rearranjo dos momentos de dipolo magnético no interior do cristal, num processo chamado de relaxamento de Néel e o tempo de relaxação característico, τ_N , é expresso pela seguinte equação:

$$\tau_N = \frac{\tau_0}{2} \sqrt{\frac{\pi T K_B}{K_{eff} V}} \exp\left(\frac{K_{eff} V}{T K_B}\right) \quad (1)$$

Nesta expressão K_B é a constante de Boltzmann, K_{eff} é a anisotropia efetiva, V é o volume da partícula e o pré-fator $\tau_0 \approx 10^{-13}$ - 10^{-9} s.^{76, 90}

Por outro lado, se os momentos magnéticos permanecerem fixo em relação ao eixo do cristal enquanto a partícula gira no fluido de dispersão, a energia será dissipada pelo movimento friccional e o processo é chamado de relaxamento browniano. O tempo característico deste mecanismo, τ_B é dado por:

$$\tau_B = \frac{3 \eta V_H}{T K_B} \quad (2)$$

Onde η é a viscosidade do líquido contendo as partículas e V_H é o volume hidrodinâmico das partículas.⁷⁶ Estes processos de dissipação de energia podem ocorrer simultaneamente e o tempo efetivo de relaxamento do sistema, τ_{ef} , é dado por:^{76, 90}

$$\frac{1}{\tau_{ef}} = \frac{1}{\tau_N} + \frac{1}{\tau_B} \quad (3)$$

A dissipação de energia, P , das SPIONPs sob influência de um CMA estabelecida pela teoria de resposta linear, LRT, pode ser calculada a partir da Equação 4. Esta é válida quando a condição $H_{max} < k_B T / \mu_0 M_s V$ é respeitada, onde μ_0 , M_s , V_p , H_{max} , k_B e T representam a permeabilidade do espaço livre, magnetização de saturação das SPIONPs, volume de SPIONPs, amplitude máxima do campo magnético externo, constante de Boltzmann e temperatura, respectivamente.^{89, 91}

$$P = \frac{1}{2} \omega \mu_0 \chi_0 H^2 \frac{\omega \tau_{ef}}{1 + \tau_{ef}^2 \omega^2} \quad (4)$$

Nesta expressão ω indica a frequência circular ($\omega = 2\pi f$), H é a amplitude do campo magnético aplicado, χ_0 é a suscetibilidade de equilíbrio do conjunto médio das SPIONPs e τ_{ef} é o tempo efetivo de relaxamento.

A eficiência de dissipação de energia das SPIONPs é um fator importante para a HM, uma vez que SPIONPs com alta eficiência de dissipação permitem a otimização da quantidade de ferrofluido injetado, minimizando assim possíveis efeitos colaterais no procedimento terapêutico.⁸³ A capacidade de aquecimento de SPIONPs sob ação de um CMA é conhecida com a perda específica de calor (SLP, do inglês *specific loss power*), definido como o poder de dissipação térmica por massa de material magnético.^{76, 80, 92} O SLP é calculado, a partir de medidas calorimétricas, de acordo com a expressão abaixo:

$$SLP = C \times \frac{m_s}{m_{MNP}} \times \frac{dT}{dt_{max}} \quad (5)$$

Nesta expressão, C é a capacidade calorífica específica da amostra, m_s é a massa da amostra, m_{MNP} é a massa de material magnético dispersa no meio, e dT/dt_{max} é a taxa de aquecimento máxima.

Em aplicações biológicas, as SPIONPs devem possuir um SLP elevado. A dissipação de calor das SPIONPs é influenciada por vários fatores, tais como: força e frequência do campo magnético aplicado, a viscosidade do solvente, o tamanho das partículas, a magnetização de saturação e a anisotropia magnética.^{76, 81, 92} O calor

dissipado pelas SPIONPs é proporcional à frequência (f) e à amplitude (H) do campo magnético aplicado. Todavia, Hergt e Dutz⁹⁰ recomendaram que o produto $H \times f$ não deve ultrapassar o valor de $5 \times 10^9 \text{ A.m}^{-1}\text{s}^{-1}$, a fim de evitar riscos ao paciente: valores de H e f muito elevados podem ocasionar o surgimento de correntes de Foucault, que são correntes elétricas induzidas pelo campo magnético dentro de um material condutor (p. ex. a água no corpo humano).⁹⁰

A metodologia de coprecipitação alcalina seguida de uma etapa de conjugação com a CUR permitiu obter os conjugados Magh-CUR. O estudo dos parâmetros de síntese da etapa de conjugação evidenciou que a concentração de CUR, pH e proporção de etanol afetaram significativamente a quantidade de CUR conjugada na superfície das nanopartículas.

Os resultados apresentados permitiram confirmar que as nanopartículas obtidas possuíram majoritariamente a fase maghemita, Magh, com morfologia esférica e tamanho médio de 13 nm. O conjugado teve a mesma morfologia e tamanho de 15 nm. Na TG foi possível identificar que a CUR está conjugada por interações fracas e ligadas covalentemente nas SPIONPs. Esta ligação foi evidenciada pelos espectros de FTIR, indicando que a CUR se liga na superfície das SPIONPs por meio de ligações coordenadas entre o grupo ceto-enol e os átomos de ferro.

A partir das medidas magnetização e HM, foi visto que tanto Magh quanto Magh-CUR apresentaram comportamento superparamagnético, porém, o conjugado teve um valor de SLP 30% menor que Magh.

A quantidade de CUR liberada dos conjugados foi inferior a 15% em 24 h, e apresentou dependência com a temperatura, indicando que os conjugados também possuem um potencial para liberação controlada com a elevação da temperatura, que pode ser promovida por HM.

Nos experimentos microbiológicos realizados, a CUR nas concentrações de 2,5, 5, 20 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveu a redução total das bactérias *S. aureus* em fase planctônica, em todas as condições testadas. As nanopartículas de Magh não apresentaram atividade fotodinâmica, mesmo na dose de luz maior (12,5 J.cm^{-2}). O conjugado Magh-CUR, na concentração de 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, apresentou ação fotodinâmica quando irradiado com luz LED azul, promovendo redução bacteriana total na dose de 3,12 J.cm^{-2} , enquanto que nos experimentos no escuro por 24 h o conjugado apresentou um baixo efeito antimicrobiano (redução de 2,5 \log_{10}), mesmo na concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Além disso, a conjugação não afeta a atividade fotodinâmica da CUR quando ela está conjugada nas SPIONPs.

Nos experimentos microbiológicos de HM na condição de CMA testada não houve redução da carga bacteriana associado ao calor gerado, indicando que a elevação de temperatura de 13 °C nos primeiros 10 min de aplicação do CMA não foi suficiente para

promover qualquer efeito citotóxico para a bactéria. Apesar disso, o efeito de aquecimento é interessante uma vez que estudos anteriores apontam para um sinergismo da aPDT e HM.

Portanto, a conjugação de CUR em SPIONPs se mostrou uma maneira promissora de dispersão da CUR em meios aquosos, além de ser uma nanoplataforma para liberação da curcumina e uma forma de combinar a aPDT e HM num mesmo nanomaterial.

REFERÊNCIAS

- 1 DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 74, n. 3, p. 417-433, Sept. 2010.
- 2 DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. **J. Antibiot.**, v. 62, n. 1, p. 5-16, Jan. 2009.
- 3 FRIERI, M.; KUMAR, K.; BOUTIN, A. Antibiotic resistance. **J. Infect. Public Health**, v. 10, n. 4, p. 369-378, Aug. 2017.
- 4 BROWN, E. D.; WRIGHT, G. D. Antibacterial drug discovery in the resistance era. **Nature**, v.529, p. 336-343, Jan. 2016.
- 5 TONG, S. Y. C. *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 28, n. 3, p. 603-661, July 2015.
- 6 TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. Anatomia funcional de células procarióticas e eucarióticas. *In:* TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Microbiologia**. 10. ed. Porto Alegre: Artmed, 2012. cap. 4, p. 76-97.
- 7 CHAMBERS, H. F.; DELEO, F. R. Waves of resistance: *Staphylococcus aureus* in the antibiotic era. **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 7, n. 9, p. 629-641, Sept. 2009.
- 8 LEE, A. S. *et al.* Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Nat. Rev. Dis. Prim.**, v. 4, May 2018. DOI: 10.1038/nrdp.2018.33.
- 9 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Antimicrobial resistance**. Geneva: [s.n.]. Disponível em: <http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en/>. Acesso em: 6 abr. 2017.
- 10 O'NEILL, J. Review on Antimicrobial Resistance: **Tackling a global health crisis: initial steps**. London: HM government, 2015. Disponível em: <https://amrreview.org/sites/default/files/Report-52.15.pdf>. Acesso em: 4 abr. 2017.
- 11 SIMPLICIO, F. I.; MAIONCHI, F.; HIOKA, N. Terapia fotodinâmica: Aspectos farmacológicos, aplicações e avanços recentes no desenvolvimento de medicamentos. **Quim. Nova**, v. 25, n. 5, p. 801-807, Set. 2002.
- 12 KOU, J.; DOU, D.; YANG, L. Porphyrin photosensitizers in photodynamic therapy and its applications. **Oncotarget**, v. 8, n. 46, p. 81591-81603, Aug. 2017.
- 13 ACKROYD, R. *et al.* The history of photodetection and photodynamic therapy. **Photochem. Photobiol.**, v. 74, n. 5, p. 656-669, Nov. 2001.
- 14 MOAN, J.; PENG, Q. An outline of the hundred-year history of PDT. **Anticancer Res.**, v. 23, n. 5A, p. 3591-3600, Sept./Oct. 2003.

- 15 QUIRK, B. J. *et al.* Photodynamic therapy (PDT) for malignant brain tumors: Where do we stand? **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 12, n. 3, p. 530-544, Sept. 2015.
- 16 BASKARAN, R.; LEE, J.; YANG, S. G. Clinical development of photodynamic agents and therapeutic applications. **Biomater. Res.**, v. 22, n. 1, Sept. 2018. DOI: 10.1186/s40824-018-0140-z.
- 17 YANO, S. *et al.* Current states and future views in photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol., C**, v. 12, n.1, p. 46-67, June 2011.
- 18 HAMBLIN, M. R. Antimicrobial photodynamic inactivation: A bright new technique to kill resistant microbes. **Curr. Opin. Microbiol.**, v. 33, p. 67-73, July 2016.
- 19 BACELLAR, I. O. L. *et al.* Photodynamic efficiency: From molecular photochemistry to cell death. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 16, n. 9, p. 20523-20559, Sept. 2015.
- 20 ONISZCZUK, A. *et al.* The potential of photodynamic therapy (PDT): Experimental investigations and clinical use. **Biomed. Pharmacother.**, v. 83, p. 912-929, Oct. 2016.
- 21 KENDALL, C. A.; MORTON, C. A. Photodynamic therapy for the treatment of skin disease. **Technol. Cancer Res. Treat.**, v. 2, n. 4, p. 283-288, Aug. 2003.
- 22 ABRAHAMSE, H.; HAMBLIN, M. R. New photosensitizers for photodynamic therapy. **Biochem. J.**, v. 473, n. 4, p. 347-364, Feb. 2016.
- 23 DAI, T.; HUANG, Y.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy for localized infections: State of the art. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 6, n. 3/4, p. 170-188, Sept. 2009.
- 24 CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: (Part one) photosensitizers, photochemistry and cellular localization. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v.1, n. 4, p. 279-293, Dec. 2004.
- 25 SHARMA, S. K. *et al.* Photodynamic therapy for cancer and for infections: What is the difference? **Isr. J. Chem.**, v. 52, n. 8/9, p. 691-705, Aug. 2012.
- 26 HUANG, L. *et al.* Type I and type II mechanisms of antimicrobial photodynamic therapy: An in vitro study on gram-negative and gram-positive bacteria. **Lasers Surg. Med.**, v. 44, n. 6, p. 490-499, Aug. 2012.
- 27 MARTINEZ, P. B. A. *et al.* Design features for optimization of tetrapyrrole macrocycles as antimicrobial and anticancer photosensitizers. **Chem. Biol. Drug Des.**, v. 89, n. 2, p. 192-206, Feb. 2017.
- 28 PLAETZER, K. *et al.* Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: Fundamental aspects. **Lasers Med. Sci.**, v. 24, n. 2, p. 259-268, Mar. 2009.
- 29 BAPTISTA, M. S. *et al.* Type I and type II photosensitized oxidation reactions: Guidelines and mechanistic pathways. **Photochem. Photobiol.**, v. 93, n. 4, p. 912-919, July 2017.

- 30 KWIATKOWSKI, S. *et al.* Photodynamic therapy: Mechanisms, photosensitizers and combinations. **Biomed. Pharmacother.**, v. 106, p. 1098-1107, Oct. 2018.
- 31 KASHEF, N.; HAMBLIN, M. R. Can microbial cells develop resistance to oxidative stress in antimicrobial photodynamic inactivation? **Drug Resist. Updates**, v. 31, p. 31-42, Mar. 2017.
- 32 MAISCH, T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. **Photochem. Photobiol. Sci.**, v.14, n. 8, p. 1518-1526, June 2015.
- 33 PRIYADARSINI, I. K. The chemistry of curcumin: From extraction to therapeutic agent. **Molecules**, v. 19, n. 12, p. 20091-20112, Dec. 2014.
- 34 ESATBEYOGLU, T. *et al.* Curcumin: From molecule to biological function. **Angew. Chem., Int. Ed.**, v. 51, n. 22, p. 5308-5332, May 2012.
- 35 GOELA, A.; KUNNUMAKKARA, A. B.; AGGARWAL, B. B. Curcumin as “Curecumin”: From kitchen to clinic. **Biochem. Pharmacol. (Amsterdam, Neth.)**, v. 75, n. 4, p. 787-809, Feb. 2008.
- 36 HEWLINGS S. J.; KALMAN D.S. Curcumin: A review of its' effects on human health. **Foods**, v. 6, n. 10, Oct. 2017. DOI:10.3390/foods6100092.
- 37 ALBADALEJO, J. G. *et al.* Curcumin and curcuminoids: Chemistry, structural studies and biological properties. **An. R. Acad. Nac. Farm.**, v. 81, n. 4, p. 278-310, Oct. 2015.
- 38 SIVIERO, A. *et al.* Curcumin, a golden spice with a low bioavailability. **J. Herb. Med.**, v. 5, n. 2, p. 57-70, June 2015.
- 39 MONDAL, S.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Stability of curcumin in different solvent and solution media: UV-visible and steady-state fluorescence spectral study. **J. Photochem. Photobiol., B**, v. 158, p. 212-218, May 2016.
- 40 WANG, Y.-J. *et al.* Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v.15, n. 12, p. 1867-1876, Aug. 1997.
- 41 SANTEZI, C.; REINA, B. D.; DOVIGO, L. N. Curcumin-mediated photodynamic therapy for the treatment of oral infections: A review. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v. 21, p. 409-415, Jan. 2018.
- 42 ANNUNZIO, S. R. de *et al.* Susceptibility of *Enterococcus faecalis* and *Propionibacterium acnes* to antimicrobial photodynamic therapy. **J. Photochem. Photobiol., B**, v. 178, p. 545-550, Jan. 2018.
- 43 AK, T.; GÜLÇİN, İ. Antioxidant and radical scavenging properties of curcumin. **Chem.-Biol. Interact.**, v.174, n. 1, p. 27-37, July 2008.

- 44 YIN, R. *et al.* Antimicrobial photodynamic inactivation in nanomedicine: Small light strides against bad bugs. **Nanomedicine**, v. 10, n. 10, p. 2379-2404, Aug. 2015.
- 45 CALIXTO, G. *et al.* Nanotechnology-based drug delivery systems for photodynamic therapy of cancer: A review. **Molecules**, v. 21, n. 3, 2016. DOI: 10.3390/molecules21030342.
- 46 LI, T.; YAN, L. Functional polymer nanocarriers for photodynamic therapy. **Pharmaceuticals**, v. 11, n. 4, 2018. DOI: 10.3390/ph11040133.
- 47 SUN, J. *et al.* Recent progress in metal-based nanoparticles mediated photodynamic therapy. **Molecules**, v. 23, n. 7, 2018. DOI: 10.3390/molecules23071704
- 48 PURI, I. K.; GANGULY, R. Particle transport in therapeutic magnetic fields. **Annu. Rev. Fluid Mech.**, v. 46, n. 1, p. 407-440, Jan. 2014.
- 49 PAULA, L. B. de *et al.* Combination of hyperthermia and photodynamic therapy on mesenchymal stem cell line treated with chloroaluminum phthalocyanine magnetic-nanoemulsion. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 380, p. 372-376, Apr. 2015.
- 50 PAULA, L. B. de *et al.* Development, characterization, and in vitro trials of chloroaluminum phthalocyanine-magnetic nanoemulsion to hyperthermia and photodynamic therapies on glioblastoma as a biological model. **J. Appl. Phys. (Melville, NY, U. S.)**, v. 111, n. 7, 2012. DOI: 10.1063/1.3671775.
- 51 HUANG, P. *et al.* Photosensitizer-conjugated magnetic nanoparticles for in vivo simultaneous magnetofluorescent imaging and targeting therapy. **Biomaterials**, v. 32, n. 13, p. 3447-3458, May 2011.
- 52 MATLOU, G. G. *et al.* Photodynamic therapy activity of zinc phthalocyanine linked to folic acid and magnetic nanoparticles. **J. Photochem. Photobiol., B**, v. 186, p. 216-224, Sept. 2018.
- 53 PENON, O. *et al.* Iron oxide nanoparticles functionalized with novel hydrophobic and hydrophilic porphyrins as potential agents for photodynamic therapy. **J. Colloid Interface Sci.**, v. 462, p. 154-165, Jan. 2016.
- 54 MBAKIDI, J. P. *et al.* Hydrophilic chlorin-conjugated magnetic nanoparticles: Potential anticancer agent for the treatment of melanoma by PDT. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 23, n. 9, p. 2486-2490, May 2013.
- 55 LU, A. H.; SALABAS, E. L.; SCHÜTH, F. Magnetic nanoparticles: Synthesis, protection, functionalization, and application. **Angew. Chem. Int. Ed.**, v. 46, n. 8, p. 1222-1244, Feb. 2007.
- 56 WU, W. *et al.* Recent progress on magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, surface functional strategies and biomedical applications. **Sci. Technol. Adv. Mater.**, v. 16, n. 2, 2015. DOI: 10.1088/1468-6996/16/2/023501.

- 57 TRAN, D. L. *et al.* Biomedical and environmental applications of magnetic nanoparticles. **Adv. Nat. Sci.: Nanosci. Nanotechnol.**, v. 1, n. 4, 2010. DOI: 10.1088/2043-6262/1/4/045013.
- 58 SHOKROLLAHI, H. A review of the magnetic properties, synthesis methods and applications of maghemite. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 426, p. 74-81, July 2017.
- 59 OLIVEIRA, L. C. A.; FABRIS, J. D.; PEREIRA, M. C. Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: Uma revisão. **Quim. Nova**, v. 36, n. 1, p.123-130, Fev. 2013
- 60 KOKSHAROV, Y. A. Magnetism of nanoparticles: effects of size, shape, and interactions. *In*: GUBIN, S. P. (ed.). **Magnetic nanoparticles**. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. chap. 6, p. 197-254.
- 61 CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. Characterization. *In*: CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides**: structure, properties, reactions, occurrences and uses. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. chap. 7, p. 139-183.
- 62 REDDY, L. H. *et al.* Magnetic nanoparticles: design and characterization, toxicity and biocompatibility, pharmaceutical and biomedical applications. **Chem. Rev.**, v. 112, n. 11, p. 5818-5878, Nov. 2012.
- 63 LAURENT, S. *et al.* Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations, and biological applications. **Chem. Rev.**, v. 108, n. 6, p. 2064-2110, June 2008.
- 64 CALLISTER, W. D. Propriedades magnéticas. *In*: CALLISTER, W. D. **Ciência e engenharia de materiais**: uma introdução. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2008. cap. 20, p. 544-571.
- 65 ABENOJAR, E. C. *et al.* Structural effects on the magnetic hyperthermia properties of iron oxide nanoparticles. **Prog. Nat. Sci.: Mater. Int.**, v. 26, n. 5, p. 440-448, Oct. 2016.
- 66 RAMIMOGHADAM, D.; BAGHERI, S.; ABD HAMID, S. B. Stable monodisperse nanomagnetic colloidal suspensions: An overview. **Colloids Surf., B**, v. 133, n. 1, p. 388-411, Sept. 2014.
- 67 CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. Surface chemistry and colloidal stability. *In*: CORNELL, R. M.; SCHWERTMANN, U. **The iron oxides**: structure, properties, reactions, occurrences and uses. 2. ed. Weinheim: Wiley-VCH, 2003. chap. 10, p. 221-252.
- 68 MORAIS, P. C.; LIMA, E. C. O. Técnicas de preparação de nanopartículas magnéticas e fluidos magnéticos. *In*: DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (ed.). **Nanotecnologia**: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação. São Paulo: Artliber, 2006. cap. 4, p. 83-99.

69. KOLESNICHENKO, V. L. Synthesis of nanoparticulate magnetic materials. *In: GUBIN, S. P. (ed.). Magnetic nanoparticles*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. chap. 2, p. 25-58.
- 70 MASSART, R. *et al.* Preparation and properties of monodisperse magnetic fluids. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 149, n. 1/2, p. 1-5, Aug. 1995.
- 71 LEFEBURE, S. *et al.* Monodisperse magnetic nanoparticles: Preparation and dispersion in water and oils. **J. Mater. Res.**, v. 13, n. 10, p. 2975-2981, Oct. 1998.
- 72 MASSART, R. Preparation of aqueous magnetic liquids in alkaline and acidic media. **IEEE Trans. Magn.**, v.17, n. 2, p. 1247-1248, Mar. 1981.
- 73 NIKIFOROV, V. N.; FILINOVA, E. Y. Biomedical applications of magnetic nanoparticles. *In: GUBIN, S. P. (ed.). Magnetic nanoparticles*. Weinheim: Wiley-VCH, 2009. chap. 10, p. 393-455.
- 74 LACAVAL, Z. G. M. Aplicações biomédicas das nanopartículas magnéticas. *In: DURÁN, N.; MATTOSO, L. H. C.; MORAIS, P. C. (ed.). Nanotecnologia: introdução, preparação e caracterização de nanomateriais e exemplos de aplicação*. São Paulo: Artliber, 2006. cap. 11, p. 175-181.
- 75 CROZALS, G. de *et al.* Nanoparticles with multiple properties for biomedical applications: A strategic guide. **Nano Today**, v. 11, n. 4, p. 435-463, Aug. 2016.
- 76 OBAIDAT, I.; ISSA, B.; HAIK, Y. Magnetic properties of magnetic nanoparticles for efficient hyperthermia. **Nanomaterials**, v. 5, n. 1, p. 63-89, Jan. 2015.
- 77 LAURENT, S. *et al.* Magnetic fluid hyperthermia: Focus on superparamagnetic iron oxide nanoparticles. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v.166, n. 1/2, p. 8-23, 2011.
- 78 CHOMOUCKA, J. *et al.* Magnetic nanoparticles and targeted drug delivering. **Pharmacol. Res.**, v. 62, n. 2, p. 144-149, Aug. 2010.
- 79 MERTZ, D.; SANDRE, O.; BÉGIN-COLIN, S. Drug releasing nanoplatforms activated by alternating magnetic fields. **Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.**, v. 1861, n.6, p. 1617-1641, June 2017.
- 80 KOZISSNIK, B. *et al.* Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity. **Int. J. Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 706-714, Oct. 2013.
- 81 BEIK, J. *et al.* Nanotechnology in hyperthermia cancer therapy: From fundamental principles to advanced applications. **J. Controlled Release**, v. 235, n. 10, p. 205-221, Aug. 2016.
- 82 BERIACHE, M. *et al.* A review on why researchers apply external magnetic field on nanofluids. **Lett. Heat Mass Transfer**, v.78, p. 60-67, Nov. 2016.

- 83 HEDAYATNASAB, Z.; ABNISA, F.; DAUD, W. M. A. W. Review on magnetic nanoparticles for magnetic nanofluid hyperthermia application. **Mater. Des.**, v. 123, n. 5, p. 174-196, June 2017.
- 84 JHA, S.; SHARMA, P. K.; MALVIYA, R. Hyperthermia: Role and risk factor for cancer treatment. **Achiev. Life Sci.**, v.10, n. 2, p. 161-167, Dec. 2016.
- 85 KOBAYASHI, T. Cancer hyperthermia using magnetic nanoparticles. **Biotechnol. J.**, v. 6, n. 11, p. 1342-1347, Nov. 2011.
- 86 NEDYALKOVA, M. *et al.* Iron oxide nanoparticles: In vivo/in vitro biomedical applications and in silico studies. **Adv. Colloid Interface Sci.**, v. 249, p. 192-212, Nov. 2017.
- 87 PARK, H. *et al.* Inactivation of *Pseudomonas aeruginosa* PA01 biofilms by hyperthermia using superparamagnetic nanoparticles. **J. Microbiol. Methods**, v. 84, n. 1, p. 41-45, Jan. 2011.
- 88 KIM, M. H. Nanoparticle-based therapies for wound biofilm infection: Opportunities and challenges. **IEEE Trans. Nanobioscience**, v. 15, n. 3, p. 294-304, Apr. 2016.
- 89 DENNIS, C. L.; IVKOV, R. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. **Int. J. Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 715-729, Dec. 2013.
- 90 DUTZ, S.; HERGT, R. Magnetic nanoparticle heating and heat transfer on a microscale: Basic principles, realities and physical limitations of hyperthermia for tumour therapy. **Int. J. Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p. 790-800, Dec. 2013.
- 91 ROSENSWEIG, R. E. E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 252, p. 370-374, Nov. 2002.
- 92 DEATSCH, A. E.; EVANS, B. A. Heating efficiency in magnetic nanoparticle hyperthermia. **J. Magn. Magn. Mater.**, v. 354, p. 163-172, Mar. 2014.
- 93 FORTIN, J. P. *et al.* Size-sorted anionic iron oxide nanomagnets as colloidal mediators for magnetic hyperthermia. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 129, n. 9, p. 2628-2635, Mar. 2007.
- 94 SCHNEIDER, C. A.; RASBAND, W. S.; ELICEIRI, K. W. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. **Nat. Methods**, v. 9, n.7, p. 671-675, June 2012.
- 95 FONER, S. Versatile and sensitive vibrating-sample magnetometer. **Rev. Sci. Instrum.**, v. 30, n. 7, p. 548-557, July 1959.
- 96 JASIM, F.; TALIB, T. Some observations on the thermal behaviour of curcumin under air and argon atmospheres. **J. Therm. Anal.**, v. 38, n. 11, p. 2549-2552, Nov. 1992.
- 97 HASMONAY, E. *et al.* PH effect on an ionic ferrofluid: Evidence of a thixotropic magnetic phase. **J. Phys. Chem. B**, v. 103, n. 31, p. 6421-6428, Aug. 1999.

- 98 EREZ, Y. *et al.* The effect of a mild base on curcumin in methanol and ethanol. **J. Phys. Chem. A**, v.116, n. 9, p. 2039-2048, Feb. 2012.
- 99 ISHII, M.; NAKAHIRA, M.; YAMANAKA, T. Infrared absorption spectra and cation distributions in (Mn, Fe)₃O₄. **Solid State Commun.**, v. 11, n. 1, p. 209-212, July 1972.
- 100 KOLEV, T. M. *et al.* DFT and experimental studies of the structure and vibrational spectra of curcumin. **Int. J. Quantum Chem.**, v. 102, n. 6, p. 1069-1079, Jan. 2005.
- 101 BHANDARI, R. *et al.* Single step synthesis, characterization and applications of curcumin functionalized iron oxide magnetic nanoparticles. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 67, p. 59-64, Oct. 2016.
- 102 MOUSSAWI, R. N.; PATRA, D. Modification of nanostructured ZnO surfaces with curcumin: Fluorescence-based sensing for arsenic and improving arsenic removal by ZnO. **RSC Adv.**, v. 6, n. 21, p. 17256-17268, Feb. 2016.
- 103 KUNDU, S.; NITHIYANANTHAM, U. In situ formation of curcumin stabilized shape-selective Ag nanostructures in aqueous solution and their pronounced SERS activity. **RSC Adv.**, v. 3, n. 47, p. 25278-25290, Sept. 2013.
- 104 PRIYADARSINI, K. I. Photophysics, photochemistry and photobiology of curcumin: Studies from organic solutions, bio-mimetics and living cells. **J. Photochem. Photobiol., C**, v. 10, n. 2, p. 81-95, June 2009.
- 105 SERANTES, D. *et al.* Magnetic ordering in arrays of one-dimensional nanoparticle chains. **J. Phys. D. Appl. Phys.**, v. 42, Oct. 2009. DOI: 10.1088/0022-3727/42/21/215003
- 106 CAZARES-CORTES, E. *et al.* Doxorubicin intracellular remote release from biocompatible oligo(ethylene glycol) methyl ether methacrylate-based magnetic nanogels triggered by magnetic hyperthermia. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 9, n. 31, p. 25775-25788, Aug. 2017.
- 107 JORI, G. *et al.* Photodynamic therapy in the treatment of microbial infections: Basic principles and perspective applications. **Lasers Surg. Med.**, v. 38, n. 5, p. 468-48, June 2006.
- 108 RIBEIRO, A. P. D. *et al.* Phototoxic effect of curcumin on methicillin-resistant *staphylococcus aureus* and 1929 fibroblasts. **Lasers Med. Sci.**, v. 28, n. 2, p. 391-398, Feb. 2013.
- 109 PILEGGI, G. *et al.* Blue light-mediated inactivation of *Enterococcus faecalis* in vitro. **Photodiagn. Photodyn. Ther.**, v.10, n. 2, p. 134-140, May 2013.
- 110 HEGGE, A. B. *et al.* Solid dispersions for preparation of phototoxic supersaturated solutions for antimicrobial photodynamic therapy (aPDT): Studies on curcumin and curcuminoides L. **Eur. J. Pharm. Biopharm.**, v. 83, n. 1, p. 95-105, Jan. 2013.

- 111 MOHAMMED, F. *et al.* A comparative study of the spectral, fluorometric properties and photostability of natural curcumin, iron- and boron- complexed curcumin. **Spectrochim. Acta A, Mol. Biomol. Spectrosc.**, v. 183, n. 5, p. 439-450, Aug. 2017.
- 112 ZHANG, S. *et al.* Enhanced photodynamic therapy of mixed phase TiO₂(B)/anatase nanofibers for killing of Hela cells. **Nano Res.**, v. 7, n. 11, p. 1659-1669, Nov. 2014.
- 113 ISMAIL, A. F. M.; ALI, M. M.; ISMAIL, L. F. M. Photodynamic therapy mediated antiproliferative activity of some metal-doped ZnO nanoparticles in human liver adenocarcinoma HepG2 cells under UV irradiation. **J. Photochem. Photobiol., B**, v. 138, n. 5, p. 99-108, Sept. 2014.
- 114 MASADEH, M. M. *et al.* Cerium oxide and iron oxide nanoparticles abolish the antibacterial activity of ciprofloxacin against gram positive and gram negative biofilm bacteria. **Cytotechnology**, v. 67, n. 3, p. 427-435, May 2015.
- 115 AZAM, A. *et al.* Antimicrobial activity of metal oxide nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria: A comparative study. **Int. J. Nanomed.**, v. 7, p. 6003-6009, Dec. 2012.
- 116 ISMAIL, R. A. *et al.* Antibacterial activity of magnetic iron oxide nanoparticles synthesized by laser ablation in liquid. **Mater. Sci. Eng. C**, v. 53, n. 1, p. 286-297, Aug. 2015.
- 117 TRAN, N. *et al.* Bactericidal effect of iron oxide nanoparticles on *Staphylococcus aureus*. **Int. J. Nanomed.**, v. 5, p. 277-283, Apr. 2010.
- 118 SHI, S.-F. *et al.* Reduced *Staphylococcus aureus* biofilm formation in the presence of chitosan-coated iron oxide nanoparticles. **Int. J. Nanomed.**, v. 11, p. 6499-6506, Dec. 2016.
- 119 RAMTEKE, C. *et al.* Synthesis and broad spectrum antibacterial activity of magnetite ferrofluid. **Curr. Nanosci.**, v. 6, n. 6, p. 587-591, 2010.
- 120 VELUSAMY, P. *et al.* Synthesis of oleic acid coated iron oxide nanoparticles and its role in anti-biofilm activity against clinical isolates of bacterial pathogens. **J. Taiwan Inst. Chem. Eng.**, v. 59, p. 450-456, Feb. 2016.
- 121 DINALI, R. *et al.* A. Iron oxide nanoparticles in modern microbiology and biotechnology. **Crit. Rev. Microbiol.**, v. 43, n. 4, p. 493-507, Jan. 2017.
- 122 TYAGI, P. *et al.* Bactericidal activity of curcumin I is associated with damaging of bacterial membrane. **PLoS One**, v. 10, n. 3, Mar. 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0121313.
- 123 DJURIŠIĆ, A. B. *et al.* Toxicity of metal oxide nanoparticles: Mechanisms, characterization, and avoiding experimental artefacts. **Small**, v. 11, n. 1, p. 26-44, Jan. 2015.

124 RAGHUNATH, A.; PERUMAL, E. Metal oxide nanoparticles as antimicrobial agents: A promise for the future. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 49, n. 2, p. 137-152, Feb. 2017.

125 KHAN, S. T.; MUSARRAT, J.; AL-KHEDHAIRY, A. A. Countering drug resistance, infectious diseases, and sepsis using metal and metal oxides nanoparticles: Current status. **Colloids Surf., B**, v. 146, p. 70-83, Oct. 2016.

126 BELLI, T.; TEMPLETON, S.; LEVI-POLYACHENKO, N. Progress on utilizing hyperthermia for mitigating bacterial infections. **Int. J. Hyperthermia.**, v. 34, n. 2, p. 144-156, Mar. 2018.

127 NGUYEN, T.-K. *et al.* Iron oxide nanoparticle-mediated hyperthermia stimulates dispersal in bacterial biofilms and enhances antibiotic efficacy. **Sci. Rep.**, v. 5, Dec. 2015. DOI: 10.1038/srep18385.

128 KIM, M.-H. *et al.* Magnetic nanoparticle targeted hyperthermia of cutaneous *Staphylococcus aureus* infection. **Ann. Biomed. Eng.**, v. 41, n. 3, p. 598-609, Mar. 2013.

129 XIA, Z. *et al.* Stimulation of fibroblast growth in vitro by intermittent radiant warming. **Wound Repair Regen.**, v. 8, n. 2, p. 138-144, Apr. 2000.

130 PRIMO, F. L. *et al.* Photosensitizer-loaded magnetic nanoemulsion for use in synergic photodynamic and magnetohyperthermia therapies of neoplastic cells. **J. Nanosci. Nanotechnol.**, v. 8, n. 11, p. 5873-5877, Nov. 2008.