

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 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.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Celso Valentim Santilli
Coorientador: Carla Raquel Fontana

1. Óxido de ferro. 2. Curcumina. 3. Fotoquimioterapia. 4. Termoterapia. 5. *Staphylococcus aureus*. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

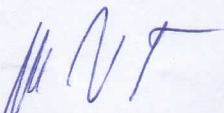
TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "Conjugação de nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro e curcumina: associação da terapia fotodinâmica e hipertermia magnética"

AUTOR: WILLIAN MAX OLIVEIRA DE SOUZA DE SANTANA

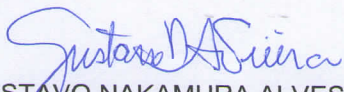
ORIENTADOR: CELSO VALENTIM SANTILLI

COORDINADORA: CARLA RAQUEL FONTANA MENDONÇA

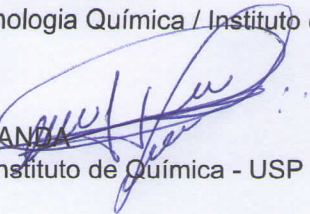
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em QUÍMICA, pela Comissão Examinadora:



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- 2ª 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^a. Carla pelos ensinamentos, apoio, respeito e compreensão.

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

À Prof^a 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 ABREVIACÕES

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 <i>curcuma longa</i> . 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 superparamagnéticos	33
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) Difratoogramas 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 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, Magh (15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e Magh-CUR (15 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) 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 g.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 kA.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 J.cm^{-2} (b), 6,25 J.cm^{-2} (c) e 3,12 J.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 J.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 J.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 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (a) e 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (b) com aplicação de um CMA ($H = 15,9 \text{ kA.m}^{-1}$ 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 Ensaios 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 Ensaios 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 meticilina, 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, consequentemente, 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 $\lambda > 1000 \text{ nm}$ pode ocasionar efeitos fototérmicos, porque nessa região ela estimula vibrações moleculares e sua energia é absorvida por moléculas de água. Para $\lambda < 625 \text{ nm}$ 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 =CH- ou $\text{-CH}_2\text{-}$, 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}

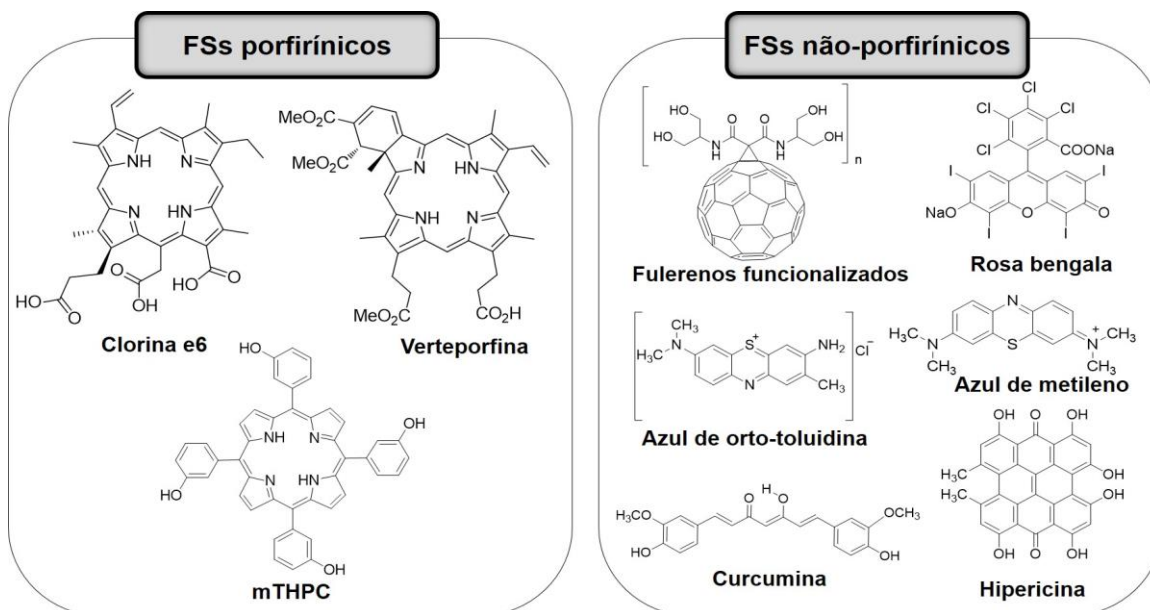


Figura 1: Estruturas de alguns fotossensibilizadores porfíricos (esquerda) e não-porfíricos (direita). Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

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}

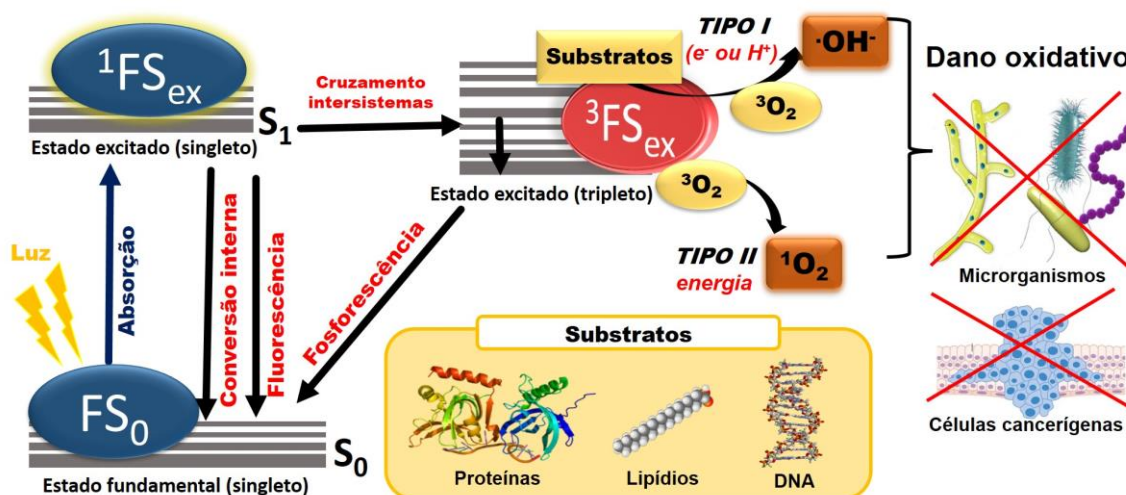


Figura 2: Representação dos processos fotofísicos e fotoquímicos envolvidos na geração de EROs pelo fotossensibilizador. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

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 alcóxila.

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 formar 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).

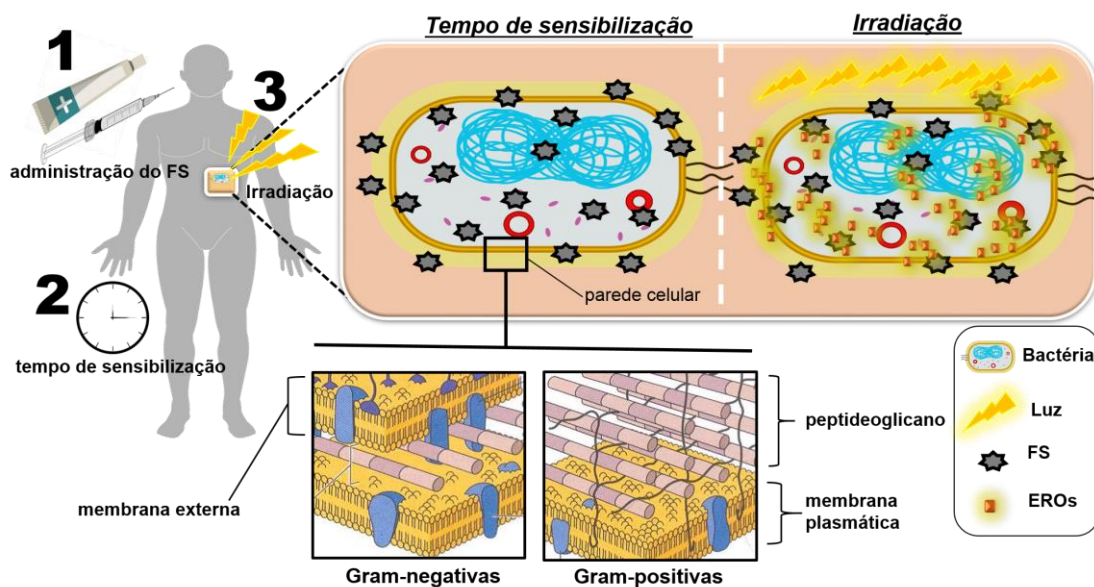


Figura 3: Representação das etapas do tratamento da terapia fotodinâmica e da ação localizada da geração de EROs em células bacterianas. Fonte: adaptado de Tortora, Funke e Case.⁶

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 singleto, 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 glutathione 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.

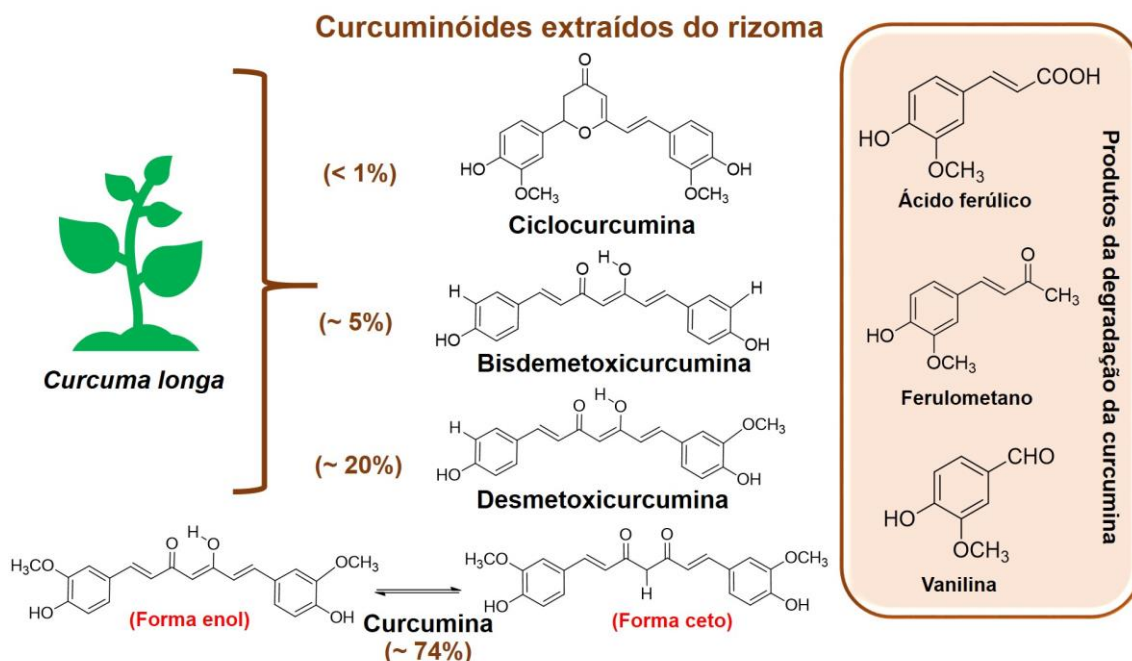


Figura 4: Estruturas químicas dos principais curcuminóides presentes no pó amarelo extraído dos rizomas da planta *curcuma longa*. No lado direito estão representadas as estruturas dos principais produtos de degradação da curcumina em meio aquoso. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

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 ($\sim 400 \text{ ng.mL}^{-1}$ 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

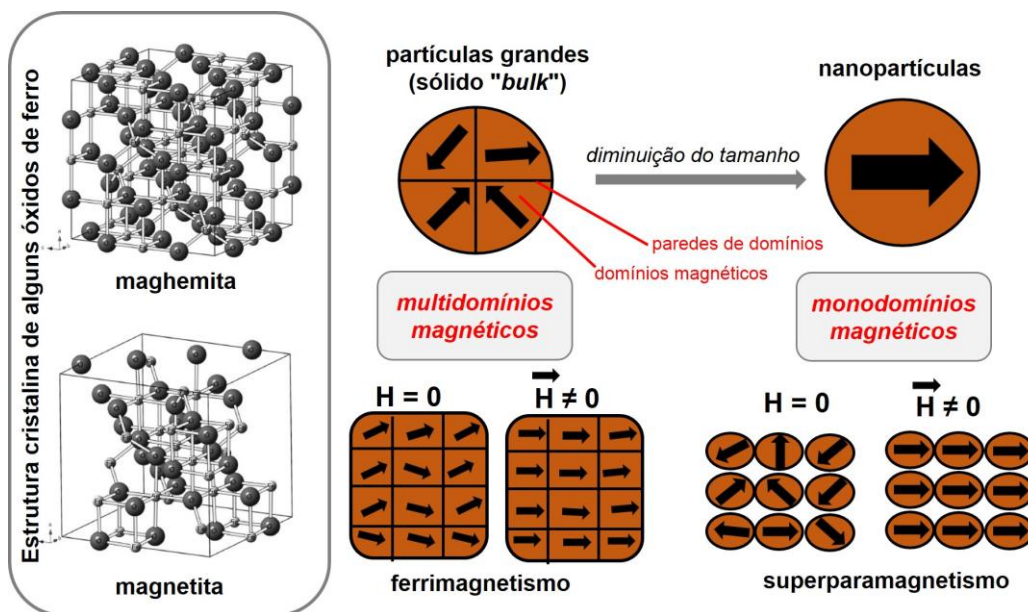


Figura 5: Representação da estrutura cristalina da magnetita e maghemita (esquerda) e o esquema da mudança no magnetismo nos nanomateriais (direita). Fonte: adaptado de Oliveira, Fabris e Pereira.⁵⁹

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.

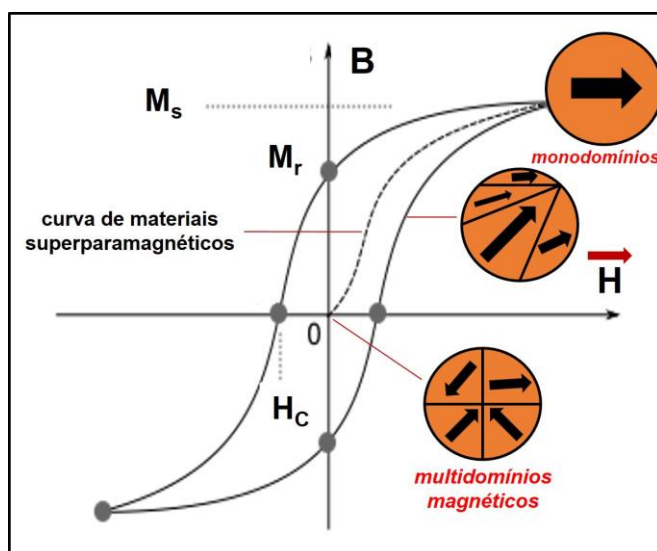


Figura 6: Curva de magnetização de materiais ferrimagnéticos e superparamagnéticos. Fonte: adaptado de Callister.⁶⁴

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}

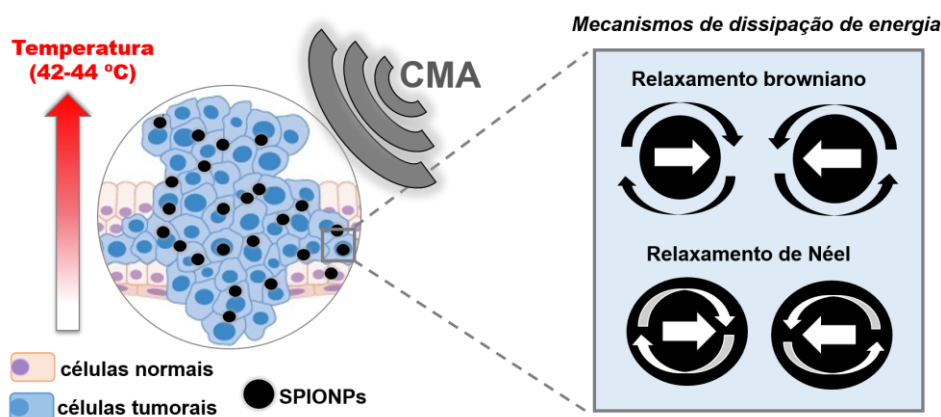


Figura 7: Representação do uso de SPIONPs sob um campo magnético externo de frequência alternada (CMA) para promover HM em células cancerígenas. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

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 Dutz ⁹⁰ 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

As infecções causadas por microrganismos resistentes à antibióticos, como o *S. aureus*, tornou-se um grave problema de saúde pública mundial, uma vez que o tratamento convencional é oneroso, ineficaz e condiciona a novas cepas resistentes. Muitas estimativas apontam que tais infecções resultarão daqui a 30 anos em taxas de mortalidade semelhantes às do câncer se o insucesso na inativação destes microrganismos patogênicos persistir. Nesta perspectiva, a OMS salienta que a busca de abordagens terapêuticas que sejam capazes de inativar os microrganismos no estágio de resistência atual, e que não leve a novos mecanismos de resistência, deve ser encarada como altamente prioritária pela comunidade científica.

Nesse panorama, a aPDT surge como uma terapia promissora para o tratamento destas infecções porque sabe-se que ela é capaz de inativar um amplo espectro de microrganismos patogênicos e acredita-se ser pouco provável que desencadeie novos mecanismos de resistência. Porém, uma das grandes dificuldades dessa terapia consiste na biodisponibilidade dos fotossensibilizadores, pois eles agregam facilmente em meios biológicos, o que diminui sua eficiência na geração de espécies reativas.

A nanotecnologia vem sendo aplicada na PDT como uma estratégia de melhorar a disponibilidade do FSs na sua forma monomérica em meios aquosos, além de outras vantagens associadas com as propriedades dos nanomateriais empregados. As SPIONPs são uma classe de nanomateriais cujas propriedades magnéticas, biocompatibilidade, estabilidade e baixo custo de síntese os tornam extensamente aplicáveis na área médica. Estes materiais são largamente usados como nanocarreadores e quando submetidos a CMA podem gerar calor, que por sua vez, causa elevação da temperatura local, podendo isto ser usado para matar células cancerígenas e inativar microrganismos.

A conjugação de fotossensibilizadores com materiais magnéticos foi proposto por alguns estudos^{50, 51, 52, 53, 54}, nos quais são explorados principalmente a combinação da HM com PDT, a eficiência da geração de EROs e a versatilidade de aplicações simultâneas nestes materiais em diagnóstico, direcionamento magnético e liberação controlada do FS. Na grande maioria destes estudos são utilizados FSs porfirínicos. Ainda não foi relatado na literatura conjugados de SPIONPs-Curcumina como agente fotossensibilizador em PDT. A curcumina pode ser extraída de fontes naturais abundantes e costuma ter um custo menor em comparação com a maioria dos FSs porfirínicos.

Portanto, este trabalho tem como objetivo a caracterização de nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticas conjugadas com curcumina, bem como a avaliação

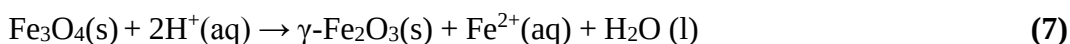
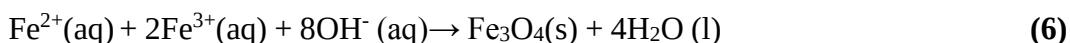
da sua aplicação em terapia fotodinâmica e hipertermia magnética por meio de ensaios microbiológicos *in vitro* contra *S. aureus* em fase planctônica. Esse objetivo central pode ser detalhado nos seguintes objetivos específicos:

- Estudo das condições de síntese das nanopartículas superparamagnéticas de óxido de ferro, fase maghemita, conjugadas com curcumina (Magh-CUR);
- Caracterização estrutural, morfológica, térmica, magnética e óptica destes conjugados;
- Avaliar a influência da conjugação de curcumina na estabilidade coloidal das nanopartículas de óxido de ferro e nas aplicações propostas;
- Realizar ensaios de liberação da curcumina presente no conjugado;
- Avaliar o emprego das nanopartículas de óxido de ferro como fotossensibilizador na inativação fotodinâmica de *S. aureus*;
- Avaliar, separadamente, o uso do conjugado Magh-CUR em hipertermia magnética e na inativação fotodinâmica de *S. aureus*;

3.1 Síntese do Ferrofluido

3.1.1 Síntese das nanopartículas de óxido de ferro

As nanopartículas de óxido de ferro (IONPs) foram preparadas por meio da rota sintética proposta por Massart,⁷⁰ que envolve duas etapas: inicialmente, obtém-se nanopartículas de magnetita (Fe₃O₄) (Equação 6); e em seguida essas são oxidadas a maghemita (γ-Fe₂O₃) (Equação 7). As nanopartículas de Fe₃O₄ foram sintetizadas a partir da coprecipitação de íons Fe²⁺ e Fe³⁺ (proporção molar 1:2) em meio alcalino.



Primeiramente, 200 mL de uma solução aquosa de cloreto férrico (FeCl₃, 1,0 mol.L⁻¹) e 100 mL de solução ácida de cloreto ferroso (FeCl₂, 1,0 mol.L⁻¹ em HCl 2 mol.L⁻¹) foram adicionados em um béquer. Em seguida, adicionou-se rapidamente 500 mL de solução de amônia (2,0 mol.L⁻¹). A mistura foi deixada sobre agitação em 800 rpm por 30 min. Após esse tempo, realizou-se a decantação do sistema com auxílio de ímãs. Posteriormente, o precipitado foi lavado com água destilada e novamente decantado. Depois, adicionou-se 100 mL de ácido nítrico (1,0 mol.L⁻¹) ao precipitado, para promover a desorção de íons amônio da superfície das IONPs. O sistema foi agitado durante 30 min e novamente decantado. Nesta etapa também ocorre a oxidação parcial da superfície das IONPs, que fica carregada positivamente.

A etapa de oxidação completa da Fe₃O₄ foi realizada a fim de obter a γ-Fe₂O₃. Para tal, adicionou-se ao precipitado 220 mL de solução fervente de nitrato férrico (Fe(NO₃)₃, 1,7 mol.L⁻¹) e o sistema foi mantido sob agitação e aquecimento (90 °C) durante 30 min. Posteriormente, o meio aquoso contendo as nanopartículas foi acidificado adicionando-se 300 mL de ácido nítrico (HNO₃, 1,0 mol.L⁻¹) e novamente o sistema foi decantado magnéticamente. Por fim, o precipitado foi lavado três vezes com acetona, duas vezes com éter e disperso em uma solução de HNO₃ (pH 2,0).

O ferrofluido resultante contém IONPs na fase maghemita, polidispersas, positivamente carregadas e estabilizadas com íons nitratos. Assim a estabilidade coloidal destas nanopartículas está relacionada à sua carga de superfície e consequentemente, às repulsões eletrostáticas, pois em pH 7,2 essas nanopartículas possuem carga nula e são estáveis em pH inferior a 4,0 e superior a 10.⁷¹

A suspensão coloidal de nanopartículas obtidas por este método é polidispersa e para reduzir a polidispersão realizou-se um processo de triagem de tamanho, que consiste numa desestabilização das interações eletrostáticas das nanopartículas via adição progressiva de ácido nítrico.⁹³ Inicialmente, adicionou-se lentamente cerca de 10 mL de solução de HNO_3 ($0,36 \text{ mol.L}^{-1}$) a 200 mL do ferrofluido previamente obtido, deixando o sistema sob agitação por 15 min. Nessa etapa, ocorre a separação em duas fases: uma superior (sobrenadante) com uma diluição maior e outra inferior (precipitado) que é mais concentrado e parcialmente floculada. Este sistema foi separado com auxílio de ímãs e o precipitado foi lavado três vezes com acetona e duas vezes com éter dietílico. O precipitado foi então disperso em água e repetiu-se o mesmo processo de desestabilização com solução de HNO_3 seguida de separação magnética e lavagens, descrito no parágrafo anterior. E finalmente, o novo precipitado desta etapa foi disperso em solução de HNO_3 ($0,01 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 2). A síntese do ferrofluido está esquematizada no diagrama da Figura 8.

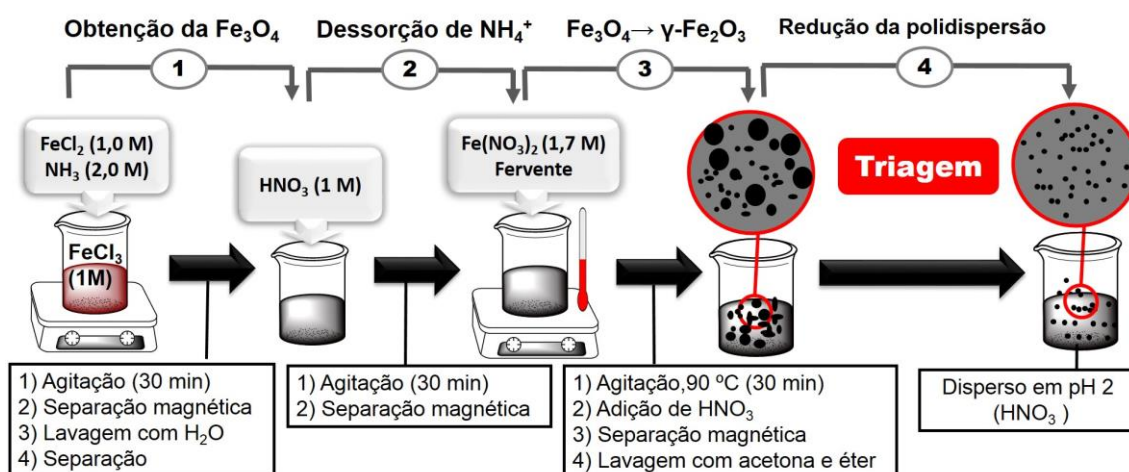


Figura 8: Diagrama esquemático da síntese de maghemita. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

3.1.2 Determinação da concentração do ferrofluido

A concentração de IONPs no ferrofluido foi determinada por meio da técnica termogravimetria. Inicialmente, tarou-se a balança do equipamento SDT Q600 da TA Instruments (instalado nas dependências do grupo de pesquisa GFQM do IQ/UNESP), sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ com o cadinho de alumina e em seguida 10 μL do ferrofluido foi adicionado nele. Este cadinho foi deixado numa estufa a 80 °C por 5 h para a completa evaporação da água. Posteriormente, o cadinho com a amostra seca foi colocado no equipamento e realizou-se o aquecimento até 500 °C, na

taxa constante de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ e sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de $100\text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$. A concentração de IONPs calculada foi de $278\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

3.1.3 Efeito dos parâmetros de síntese do conjugado IONP-Curcumina

Para promover a conjugação entre as IONPs e a curcumina, $37,5\text{ mL}$ do ferrofluido com $1,4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de IONPs dispersas em meio aquoso com pH 5,5 foi aquecido a $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ e em seguida adicionou-se, lentamente, $12,5\text{ mL}$ de uma solução de curcumina ($1,6\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, dissolvida em álcool etílico anidro), de modo que a proporção final em massa de CUR/IONPs foi igual a 0,4. O sistema foi mantido fechado, sob agitação e aquecimento por 12 h e em seguida foi centrifugado por 45 min numa velocidade de 12.000 rpm e o decantado foi lavado duas vezes com álcool etílico, para remoção da curcumina não conjugada. Em seguida realizou-se outra etapa de lavagem com água destilada para assegurar a remoção do álcool. A descrição acima é correspondente à condição de síntese n.º 1 da Tabela 1.

As IONPs maghemita e os conjugados IONP-curcumina preparados foram denominados neste trabalho como Magh e Magh-CUR, respectivamente.

A preparação do conjugado Magh-CUR foi estudada variando os parâmetros de síntese, tais como a concentração de CUR ($0,1$, $0,2$ e $0,4\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), pH do meio ($2,0$, $4,0$ e $5,5$) e a proporção de etanol (25 , 50 e 75%) no meio. Na Tabela 1 estão apresentadas as condições de síntese empregadas. A temperatura, o tempo de síntese, o modo de separação e os passos de lavagens foram iguais para todas as condições.

Tabela 1: Condições de síntese do conjugado Magh-CUR.

Nº	[CUR]/ $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	pH do meio	% Etanol	CUR/Magh
1	0,4	5,5	25	0,4
2	0,2	5,5	25	0,2
3	0,1	5,5	25	0,1
4	0,4	2,0	25	0,4
5	0,4	4,0	25	0,4
6	0,4	5,5	50	0,4
7	0,4	5,5	75	0,4

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

3.2 Técnicas de Caracterização

3.2.1 Termogravimetria (TG)

A influência das condições de síntese na quantidade de curcumina conjugada à superfície das nanopartículas foi avaliada por termogravimetria, na qual as amostras secas foram aquecidas entre 25 a 800 °C na velocidade de aquecimento de 10 °C·min⁻¹ e sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 100 cm³·min⁻¹, no equipamento SDT Q600 (TA Instruments).

3.2.2 Difração de raios X (DRX)

Os difratogramas de raios X das amostras na forma de pó foram obtidos em um equipamento Siemens, modelo D5000 Difrac plus XRD Commander (instalado no IQ/UNESP). A varredura em 2 θ foi realizada na faixa de 4° a 80°, com passo de 0,02°/4 s, empregando radiação monocromática de Cu (K α) com $\lambda=1,5418$ Å. Os picos de difração dos difratogramas obtidos foram indexados usando o software *Crystallographica Search-Match* e as fichas utilizadas como padrão foram a da γ -Fe₂O₃ (PDF nº 39-1346) e Fe₃O₄ (PDF nº 16-629).

As distâncias entre os planos cristalográficos dos picos de difração apresentados nos difratogramas foram calculados usando a Lei de Bragg:

$$n\lambda = 2d \sin \theta \quad (8)$$

Nessa expressão, θ representa o ângulo da radiação incidente, d a distância entre planos atômicos no cristal e λ é o comprimento de onda da radiação incidente. Os parâmetros de rede das amostras foram estimados utilizando a equação:

$$d = \frac{a}{\sqrt{(l^2+k^2+h^2)}} \quad (9)$$

Onde a é o parâmetro de rede da célula unitária e (h, k, l) são os índices de Miller.

3.2.3 Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A morfologia das amostras foi analisada através de imagens observadas em um microscópio eletrônico de transmissão JEOL CX-100, instalado no laboratório de microscopia eletrônica da *Faculté de Chimie de l'Université Pierre et Marie Curie* (UPMC) por intermédio da Prof^a. Christine Ménager. Para a aquisição das imagens, as amostras foram gotejadas sobre uma superfície de uma rede de cobre revestida com

carbono. A análise do tamanho das nanopartículas foi realizada com auxílio do software ImageJ.⁹⁴

3.2.4 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de fourier com acessório de refletância total atenuada (FTIR/ATR)

As medidas das amostras na forma de pó foram feitas em um espectrofotômetro de absorção na região do infravermelho médio com transformada de Fourier-Vertex 70, da Bruker (instalado no IQ/UNESP), empregando um acessório de refletância total atenuada com cristal de diamante. Os espectros foram obtidos no intervalo de 4000 a 400 cm^{-1} , na velocidade de 4 min.s^{-1} (64 varreduras).

3.2.5 Potencial zeta

As medidas foram realizadas em um equipamento Malvern, modelo Zetasizer Nano ZS (instalado no Laboratório de Materiais Magnéticos e Coloides no IQ/UNESP). As nanopartículas foram dispersas em água deionizada, na concentração de 0,05% (m/m), com força iônica ajustada (NaCl, 1 mM). A titulação foi realizada na faixa de pH de 3 a 10.

3.2.6 Espectroscopia na região do UV-vis

Os espectros de absorção do UV-vis das soluções de curcumina e das nanopartículas foram obtidos num espectrômetro Cary 60 UV-vis, da Agilent Technologies (instalado nas dependências do grupo de pesquisa GFQM do IQ/UNESP), usando uma cubeta de quartzo com caminho ótico de 1 cm. Todas as amostras foram dispersas em tampão fosfato pH = 7,2, a 25°C.

3.2.7 Magnetometria de amostra vibrante

As curvas de magnetização das amostras, dispersas em água deionizada, foram medidas usando um magnetômetro de amostra vibrante (VSM, *Vibrating Sample Magnetometer*)⁹⁵ instalado no laboratório de medidas magnéticas *Mesures Physiques à Basse Température* da *Faculté de Chimie de l'Université Pierre et Marie Curie* (UPMC) por intermédio da Prof^a. Christine Ménager. As curvas de magnetização em função de um campo magnético foram registradas entre 0 a 9 kOe, na temperatura de 293 K.

3.2.8 Hipertermia magnética

O comportamento das suspensões coloidais das nanopartículas sob aplicação de um campo magnético alternado (CMA) foi avaliado através de medidas de hipertermia

magnética (HM). Estas medidas foram realizadas em um equipamento DM100 Series da nanoScale Biomagnetics (instalado nas dependências do grupo de pesquisa GFQM do IQ/UNESP), que permite a combinação de quatro frequências (f) fixas (203, 208, 280, 420 kHz) e intensidades de campo (H) reguláveis entre 2,9 a 15,9 kA.m⁻¹.

As medidas foram realizadas em triplicata. Inicialmente, foram feitas as medidas de HM da suspensão de Magh (12 g.L⁻¹ em pH 4) nas seguintes combinações de campo e frequência: i) 280 kHz e 10,6 kA.m⁻¹; ii) 280 kHz e 15,9 kA.m⁻¹; iii) 420 kHz e 10,6 kA.m⁻¹; iv) 420 kHz e 5,3 kA.m⁻¹. E com base nos resultados apresentados e discutidos na secção 4.3 escolheu-se a combinação ii) para fazer as medidas de HM das suspensões de Magh e Magh-CUR em diferentes concentrações.

A partir das curvas de temperatura em função do tempo foi calculada a taxa de aquecimento máxima ($dT/dt_{\max}$) através de uma regressão linear no início da curva (padronizado nesse trabalho como sendo os 15 s iniciais). Com este valor obteve-se o valor da perda específica de calor (SLP) a partir da Equação 5, assumindo a capacidade calorífica do sistema como sendo a da água, 4.18 J.g⁻¹°C⁻¹.¹⁸

3.3 Liberação da Curcumina *in vitro*

Os ensaios de liberação *in vitro* da curcumina ligada à superfície das nanopartículas no conjugado Magh-CUR foram realizados em tampão fosfato a pH 7,2 com 0,5 % m/m do surfactante polissorbato 80 (tween 80), nas temperaturas de 25, 37 e 45 °C, nos quais 10 mg do conjugado foram adicionados em 40 mL de solução.

A quantidade de curcumina liberada foi acompanhada a partir dos espectros de absorção no UV-vis de alíquotas coletadas em tempos determinados, durante 24 horas. Os espectros foram coletados em um espectrômetro Cary 60 UV-Vis, da Agilent Technologies. Para fazer a curva de calibração foram medidos os espectros de absorção de soluções com diferentes concentrações de curcumina no mesmo tipo de meio em que foi realizado a liberação. Os valores máximos das absorbâncias em 426 nm em função da concentração foram usados para construir a curva analítica (Figura 9 a-b).

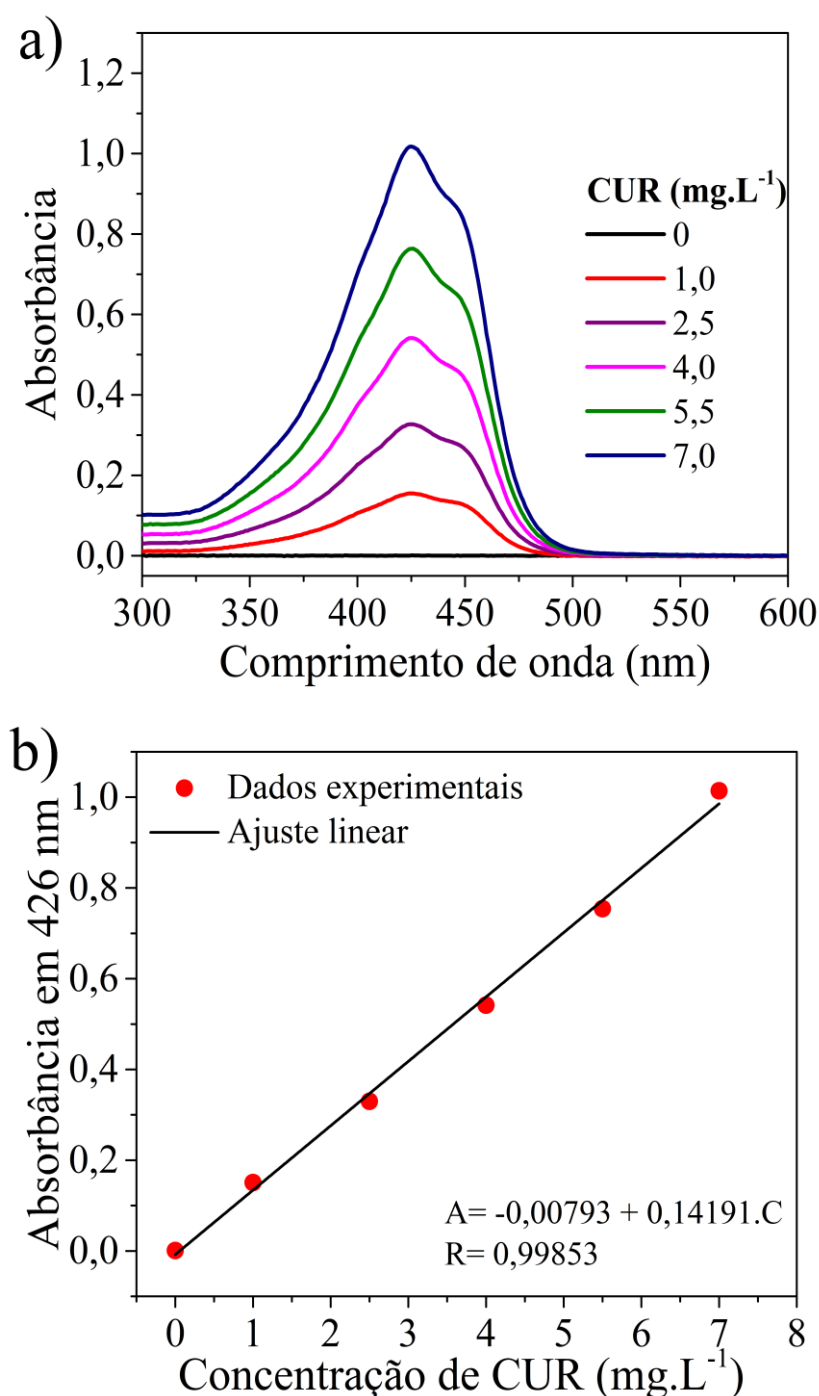


Figura 9: (a) Espectros na região do visível para a curcumina em diferentes concentrações dispersa em tampão fosfato a pH 7,2 com 0,5 % m/m do surfactante tween 80 e (b) curva analítica obtida. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

3.4 Ensaios Microbiológicos em Fase Planctônica

Os ensaios microbiológicos foram realizados com *Staphylococcus aureus* em fase planctônica (suspensão) para avaliar a potencial aplicação das Magh-CUR na terapia fotodinâmica antimicrobiana e hipertermia magnética. Todos os experimentos

microbiológicos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP-Araraquara.

3.4.1 Cepa bacteriana e meios de cultivo

- **Cepa bacteriana:** Cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- **Meios de cultura:** As placas de ágar foram preparadas, utilizando o meio *Tryptic Soy Agar* (TSA, da Acumedia Lansing, Michigan) e o caldo usado foi o meio de cultura *Tryptic Soy Broth* (TSB, da Acumedia Lansing, Michigan), ambos com formulações tamponadas em pH $7,3 \pm 0,2$ a 25°C.

3.4.2 Fotossensibilizador e fonte de luz

Nos experimentos foi empregada como fotossensibilizador a curcumina (Sigma Aldrich) diluída em uma mistura 25% (v/v) etanol/água, preparadas a partir de uma solução de curcumina ($400 \mu\text{g.mL}^{-1}$, dissolvida em etanol anidro) nas seguintes concentrações: 1,25, 2,5, 5,0, 20 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As nanopartículas Magh e Magh-CUR também foram testadas como FSs, sendo dispersas em solução aquosa ajustada em pH 7,2 nas concentrações desejadas (125, 250, 500, $1500 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e (125 e $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$), respectivamente.

Nos experimentos da terapia fotodinâmica foi utilizado uma fonte de luz LEDs modelo IrradLED® da marca Biopdi, empregando irradiação no comprimento de onda de 450 nm. As doses de luz empregadas nos experimentos foram 12,50, 6,25 e $3,12 \text{ J.cm}^{-2}$, na irradiância de 107 mW.cm^{-2} .

3.4.3 Terapia fotodinâmica, ensaios no escuro e de hipertermia magnética

A bactéria foi crescida em ágar (placa) na condição de aerobiose e incubada em estufa a 37°C, durante 24 h. Esta placa estoque foi mantida na geladeira e replicada semanalmente. Inicialmente, realizou-se a etapa de inoculação, na qual a cepa bacteriana foi retirada da placa estoque e suspensa em um tubo de ensaio, contendo 4 mL de caldo TSB. Este tubo foi homogeneizado e colocado na estufa a 37 °C durante 18 h, para que a bactéria chegasse em sua fase de crescimento exponencial (fase log), para a realização do ensaio microbiológico. Após este período, a suspensão bacteriana foi ajustada para $\sim 1 \times 10^8$ células/mL através de leitura espectrofotométrica em 630 nm, considerando a densidade ótica entre 0,08-0,1. Após esta padronização, um volume de 50 μL foi

transferido para uma placa de 96 poços e acrescentou-se 50 μL da solução da curcumina, Magh ou Magh-CUR, nas concentrações desejadas. Os ensaios foram realizados em três ocasiões independentes. Para cada ocasião experimental, todos os grupos testados foram realizados em triplicata.

A suspensão bacteriana e a solução do fotossensibilizador foram deixadas em contato durante 5 min no escuro, o que configura o tempo de pré-incubação. Após este tempo, a placa de 96 poços foi irradiada em uma fonte de luz LEDs no comprimento de onda de 450 nm por um tempo suficiente para atingir a densidade de energia desejada em cada situação testada.

Após o tratamento, as bactérias foram diluídas através da técnica de microdiluição seriada na própria placa de 96 poços. Em seguida, 5 μL da última diluição foi colocado em placas com ágar. A contagem de colônias foi realizada depois de 24 h de incubação a 37 °C, na condição de aerobiose. A metodologia completa está esquematizada na Figura 10.

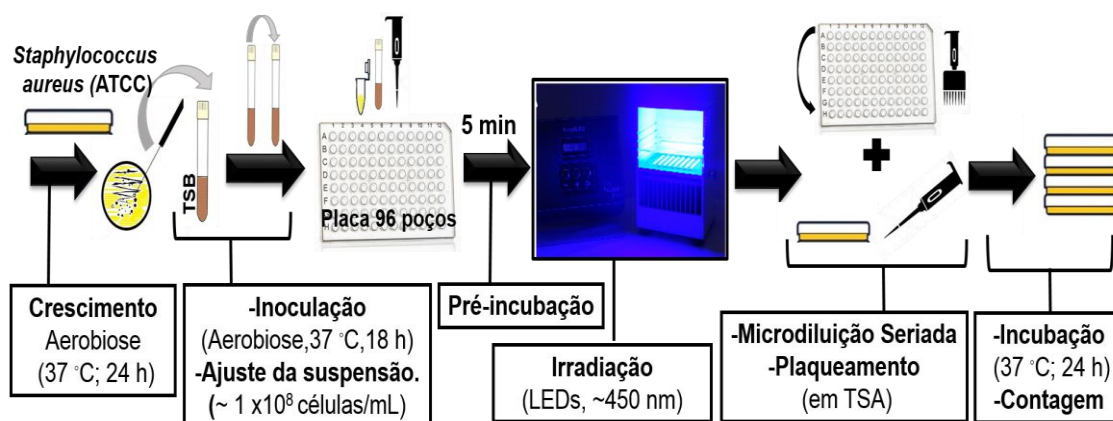


Figura 10: Esquema do experimento da terapia fotodinâmica. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Os grupos testados no escuro foram realizados da mesma forma com a exceção da etapa de irradiação. No caso do experimento de 24 h, as nanopartículas de Magh e Magh-CUR ficaram em contato com a bactéria durante esse tempo em estufa a 37 °C.

Os experimentos de hipertermia magnética com os conjugados Magh-CUR foram realizados da mesma forma que os de PDT, com exceção do tempo de incubação (20 min) e aplicação de CMA ($H = 15,9 \text{ kA} \cdot \text{m}^{-1}$ e $f = 280 \text{ kHz}$) no equipamento DM100 Series da nanoScale Biomagnetics, durante 20 min, ao invés da irradiação.

A toxicidade da irradiação de luz LED azul ou do CMA sobre as bactérias foram avaliadas nos grupos de controle de luz e de campo magnético, denominados controle de luz (CL) e de campo (CH), respectivamente. Nestes de 50 µL da suspensão bacteriana e 50 µL do caldo TSB foram colocados em contato no mesmo tempo (incubação + tratamento) dos grupos de aPDT, escuro ou HM na presença do estímulo físico (CMA ou luz) a ser testado.

A redução da carga microbiana dos grupos de tratamento/escuro foi comparada em relação um grupo de controle de crescimento (CC), que foi realizado nas mesmas condições experimentais, mas sem o FSs ou agente antimicrobiano e sem aplicação dos estímulos físicos (CMA ou luz LED). Este grupo foi composto de 50 µL da suspensão bacteriana e 50 µL do caldo TSB, em contato no mesmo tempo dos grupos de tratamento.

Cabe também ressaltar, que todos os materiais e soluções foram previamente esterilizados e os experimentos foram conduzidos em sistema de fluxo, também previamente esterilizado com luz ultravioleta.

3.4.4 Análise estatística

Os valores das variáveis contínuas entre os grupos foram comparados através do teste de análise de variância (*one-way ANOVA*), com pós-teste de Tukey. As análises foram realizadas usando o *software* GraphPad Prism®, versão 5.01 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, EUA). O nível de significância adotado para os testes estatísticos foi de 5% ($p < 0,05$).

4.1 Efeito dos Parâmetros de Síntese do Conjugado Magh-CUR

As curvas termogravimétricas (TG) de Magh, curcumina (CUR) e Magh-CUR estão apresentadas na Figura 11a. e as derivadas primeiras destas curvas, dTG, estão exibidas na Figura 11b.

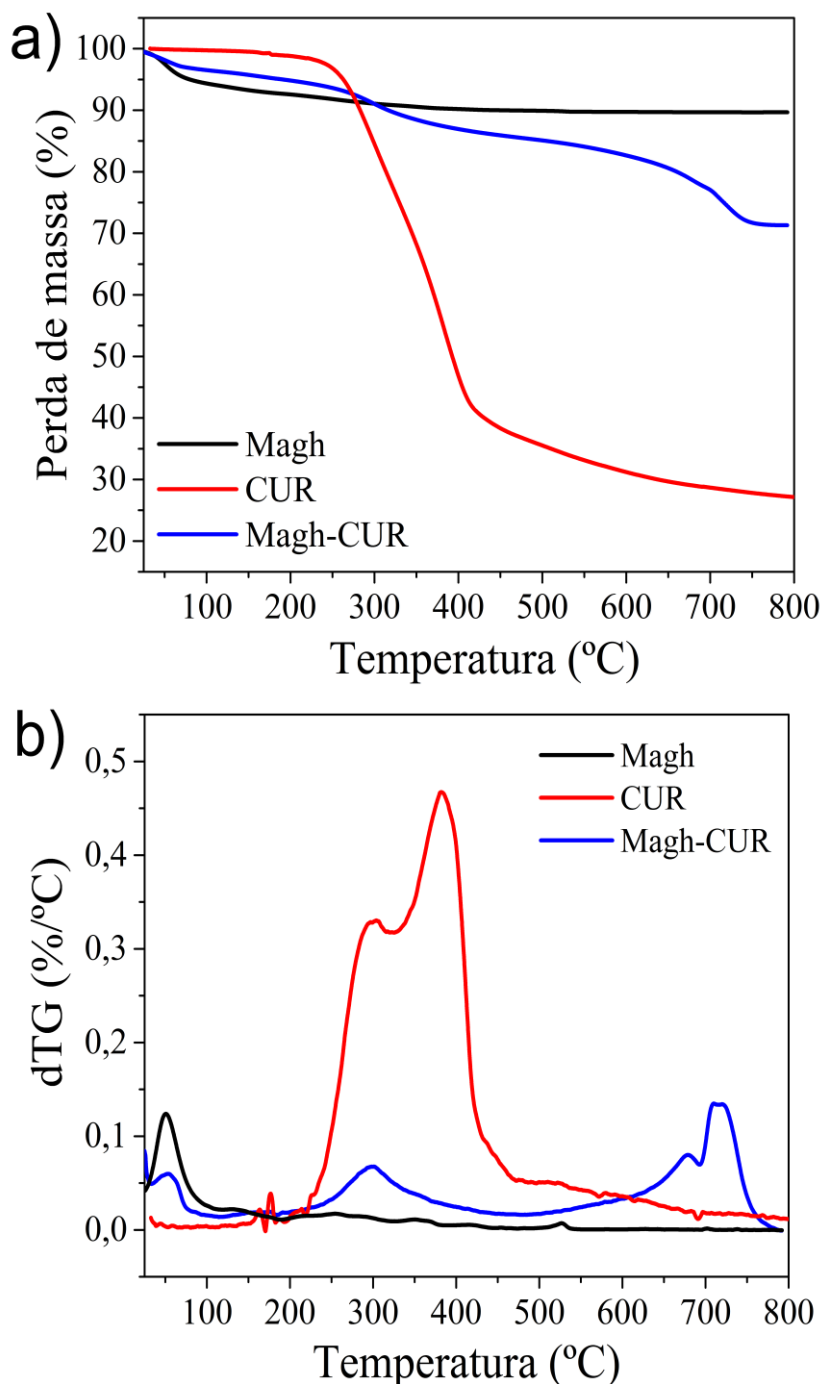


Figura 11: (a) Curvas termogravimétricas da curcumina, Magh e Magh-CUR sob atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) em uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$; (b) Derivada primeira das curvas termogravimétricas. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A curva TG da Magh possui uma perda de massa (10,2 %) até 120 °C, que pode ser atribuído à evaporação de água na superfície das nanopartículas. A CUR permanece estável até 200 °C, quando começa um grande evento de perda de massa que está dividido em dois estágios consecutivos, ambos podem ser bem visualizados na dTG. O primeiro estágio ocorre entre 200 a 324 °C, com uma perda de massa de 21,7 % atribuída à evaporação de subprodutos voláteis de baixo peso molecular proveniente da degradação, como acetona, $(\text{CH}_3)_2\text{CO}$, e o acetaldeído, CH_3COH . Este evento ocorre logo após o ponto normal de fusão da curcumina que situa-se em 180°C.⁹⁶ O segundo estágio aparece entre 324 e 475 °C com uma perda de massa de 45% referente à saída de produtos voláteis maiores como o ácido fenil oxiacético, $\text{C}_6\text{H}_5\text{OCH}_2\text{COOH}$.⁹⁶ Em 800 °C, o resíduo final é de 27%, que pode ser atribuída à formação de carbono amorfo, estável em altas temperaturas.⁹⁶

O conjugado Magh-CUR possui duas regiões de perda de massa, além da pequena perda inicial referente a saída de moléculas de água, sendo elas 10% e 13% ocorridas nos intervalos 200-450 °C e 550-800 °C, respectivamente. A primeira perda é referente a degradação térmica da CUR não ligada covalentemente na superfície, enquanto que a segunda perda é atribuída à CUR ligada covalentemente na superfície. O início do segundo evento ocorre em 550 °C, uma temperatura maior que a evaporação da CUR, indicando que a ligação da CUR na superfície das nanopartículas através da porção ceto-enol, como será discutido na seção 4.2 nos resultados de FTIR, confere grande estabilidade térmica ao conjugado.

As curvas de TG também foram usadas para prever a quantidade de CUR presente em Magh-CUR. Considerando o resíduo de carbono amorfo proveniente da CUR em 800 °C, 27%, e a perda total de massa do conjugado entre 200 °C e 800°C, 23%, a percentual de massa da CUR total presente no conjugado foi calculado como sendo ~ 32%.

As curvas termogravimétricas das amostras secas dos conjugados obtidos empregando-se diferentes condições de síntese estão apresentados nas Figuras 12a-c. Estas curvas estão separadas de acordo com o tipo de parâmetro variado.

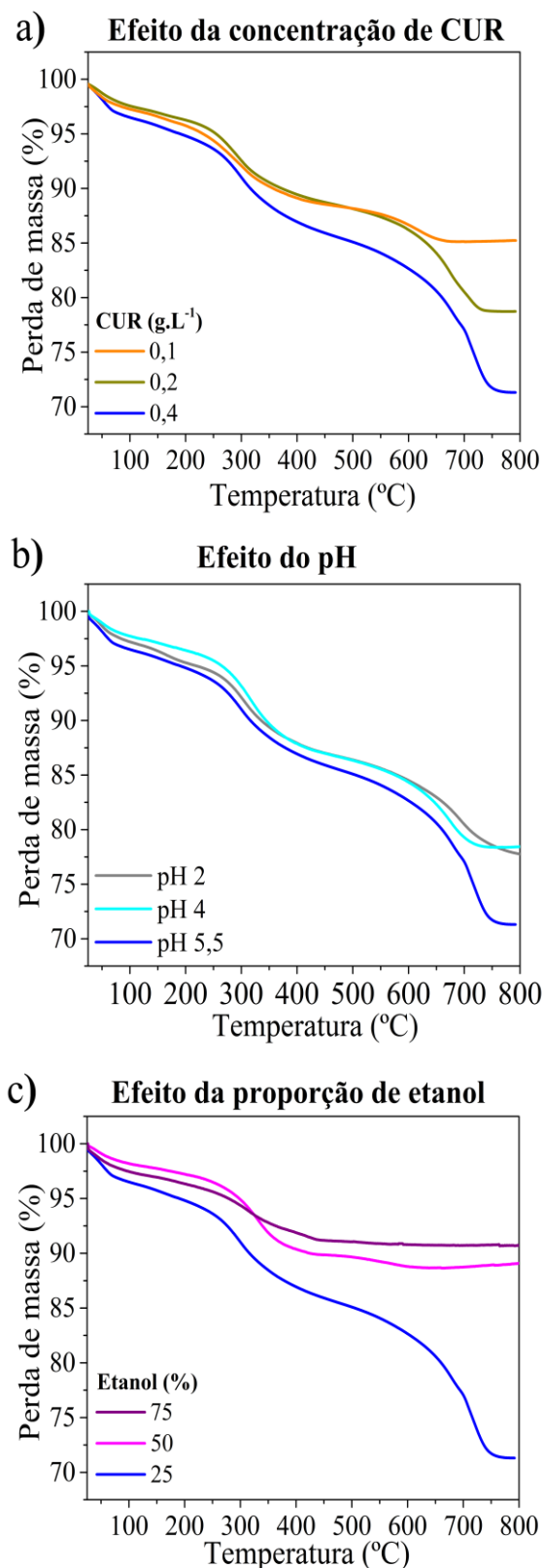


Figura 12: Curvas termogravimétricas sob atmosfera de nitrogênio ($100 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$) em uma taxa de aquecimento de $10 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ dos conjugados Magh-CUR preparados variando **(a)** a concentração de CUR e mantendo fixo o pH 5,5 e 25% etanol; **(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. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

As curvas termogravimétricas apresentam três regiões principais de perda de massa, sendo as duas perdas em temperaturas acima de 200 °C referentes a presença de CUR na superfície das nanopartículas. As pequenas perdas de massa observadas abaixo de 150 °C referem-se a saída de moléculas de água adsorvida na superfície de Magh-CUR, enquanto que toda perda acima de 200 °C é atribuída a evaporação e degradação da CUR, pois conforme visto na discussão dos resultados de TG das Figuras 11 a Magh não sofre degradação térmica no intervalo de temperatura em que as medidas foram feitas. A perda de massa entre 200 e 450 °C foi atribuída à evaporação de CUR não ligada covalentemente, enquanto que a perda acima de 550 foi atribuída à termo decomposição da CUR ligada na superfície. As percentagens destas duas perdas de massa estão mostradas na Tabela 2.

Tabela 2: CUR não ligada e ligada covalentemente em Magh-CUR preparados em diferentes condições de síntese.

Nº	Parâmetro	Variação	Perda de massa (%) entre 200-800 °C	% CUR**	% CUR _{ligada}	% CUR _{Total}
1	[CUR]	0,4 g.L ⁻¹	23,0	13,7	17,8	31,5
2		0,2 g.L ⁻¹	18,2	11,0	13,9	24,9
3		0,1 g.L ⁻¹	11,6	12,2	3,7	15,9
4	pH	2,0	16,6	12,9	9,8	22,7
5		4,0	18,8	11,4	14,4	25,8
*		5,5	23,0	13,7	17,8	31,5
*	% etanol	25%	23,0	13,7	17,8	31,5
6		50%	8,7	10,0	1,9	11,9
7		75%	6,3	7,1	1,5	8,6

*Repetição da condição nº 1; **não ligada covalentemente;

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A concentração de CUR (Figura 12a) é proporcional a quantidade de CUR total presente na superfície das nanopartículas, uma vez que para as concentrações de 0,1, 0,2 e 0,4 g.L⁻¹ a percentagem de CUR total foi 15,9, 24,9 e 31,5 %, respectivamente. Em meios aquosos a CUR possui baixa solubilidade e o aumento da sua concentração favorece a interação dela com a superfície das nanopartículas.

O pH do meio afeta a quantidade de CUR total ligada (Figura 12b). Para os pH 2, 4 e 5,5 a perda de massa foi de 22,7, 25,8 e 31,5%, respectivamente. A maghemita possuem um ponto isoelétrico em ~ pH 7,2, em que a quantidade de carga de superfície positiva e negativa são iguais.⁹⁷. Dentre os pH testados, o de 5,5 proporcionou maior ligação da curcumina na superfície, porque este está mais próximo do ponto isoelétrico, que é uma situação em que a interação de moléculas na superfície das nanopartículas é favorecida.

Por fim, a influência da proporção de etanol na formação dos conjugados (Figura 12c) foi investigado empregando-se as percentagens de 25, 50 e 75% de etanol. Nas três últimas entradas da Tabela 2 pode-se observar que a percentagem de 25% de etanol conduziu a uma perda de massa bem mais significativa que nas percentagens maiores de etanol. Em sistemas água-etanol a solubilidade da CUR é proporcional a quantidade de etanol no meio.⁹⁸ Portanto, a maior proporção de etanol no meio torna a CUR mais solúvel e isto desfavorece sua interação com a superfície das nanopartículas.

Todos os parâmetros investigados afetaram a quantidade de CUR conjugada a superfície. O conjugado sintetizado na condição nº 1 da Tabela 2 teve a maior perda de massa, e conseqüentemente, favoreceu a ligação de uma maior quantidade de CUR na superfície das nanopartículas e por isso esta condição foi a empregada no preparo do conjugado Magh-CUR.

4.2 Características das Amostras na forma de Pós

As amostras na forma de pós foram caracterizadas por meio de difratometria de raios X (DRX). Os difratogramas das amostras, assim como os padrões de referência da maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) e da magnetita (Fe_3O_4) estão apresentados na Figura 13

Os difratogramas das amostras apresentam picos característicos da fase de óxido de ferro do tipo espinélio, em $2\theta = 30,2, 35,5, 43,4, 53,9, 57,2$ e $63,1^\circ$ referentes aos planos cristalográficos (220), (311), (400), (422) (511) e (440), respectivamente.⁶¹

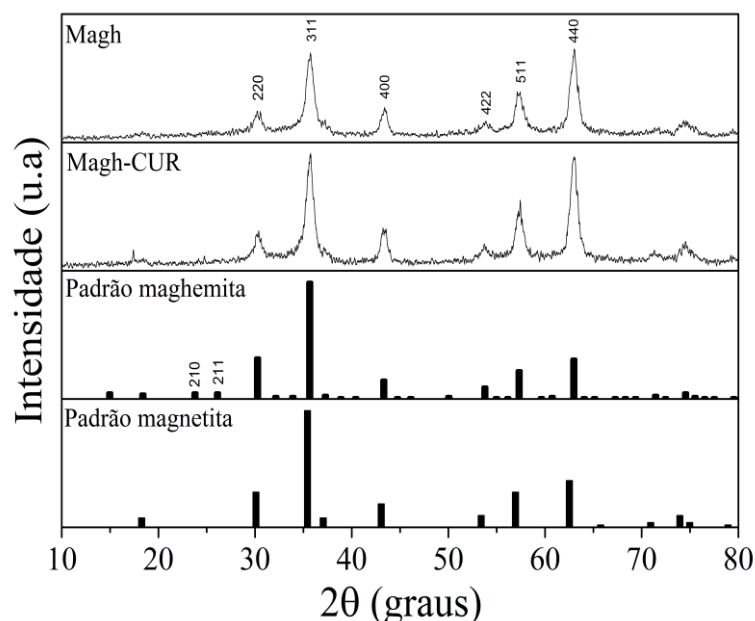


Figura 13: Difratogramas de raios X das amostras de Magh e Magh-CUR e dos padrões de magnetita e maghemita. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Os difratogramas da $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ e Fe_3O_4 apresentam picos de difração muito semelhantes entre si, devido ao fato de ambos possuírem estruturas cristalinas do tipo espinélio. A magnetita apresenta uma estrutura espinélio invertida, na qual os íons O^{2-} estão coordenados aos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} em interstícios octaédricos e a íons Fe^{3+} nos interstícios tetraédricos.⁶¹ A maghemita possui uma estrutura cúbica de espinélio, muito similar a da magnetita, porém possui como único cátion o Fe^{3+} .⁶¹

A maghemita possui dois picos característicos em 23,8 e 26,1 graus, correspondentes aos planos cristalográficos (2 1 0) e (2 1 1), respectivamente.⁶¹ Porém, não é possível identificar a fase a partir desta informação, porque estes picos são bem pouco intensos e os difratogramas obtidos possuem uma região inicial ruidosa que coincide com a região em que os picos aparecem.

Para a identificação da fase de óxido de ferro obtida, primeiro foi calculado as distâncias interplanares dos principais picos de difração das amostras e dos padrões de referência, empregando a Lei de Bragg (Equação 8). E por fim, os parâmetros de rede da célula unitária para cada pico de difração foi calculado a partir destes valores de distância e dos índices de Miller (h k l), usando a Equação 9. Os resultados estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3: Distâncias interplanares, d, e parâmetros de rede, a, dos principais picos de difração das amostras e dos padrões de referência.

h k l	$\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$ (Padrão)		Fe_3O_4 (Padrão)		Magh		Magh-CUR	
	d (Å)	a (Å)	d (Å)	a (Å)	d (Å)	a (Å)	d (Å)	a (Å)
2 2 0	2,95	8,35	2,97	8,40	2,97	8,40	2,96	8,37
3 1 1	2,52	8,35	2,53	8,40	2,51	8,33	2,53	8,39
4 0 0	2,09	8,35	2,10	8,40	2,09	8,36	2,08	8,34
4 2 2	1,70	8,35	1,71	8,40	1,71	8,36	1,70	8,34
5 1 1	1,61	8,35	1,62	8,40	1,61	8,36	1,61	8,35
4 4 0	1,48	8,35	1,48	8,40	1,47	8,34	1,48	8,35
Média	-	8,35	-	8,40	-	$8,36 \pm 0,02$	-	$8,36 \pm 0,02$

Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A média dos parâmetros de rede calculados para as amostras Magh e Magh-CUR foram $8,36 \pm 0,02$ e $8,35 \pm 0,02$ Å, respectivamente. Estes valores são iguais ao parâmetro de rede calculado para o padrão da maghemita, 8,35 Å. Isto permite inferir que a fase majoritária do óxido de ferro obtido é a maghemita, mas como as fases são muito

semelhantes também pode haver a fase magnetita numa proporção menor apesar da etapa de oxidação realizada na síntese.

A morfologia e tamanho das nanopartículas foram determinados por meio de imagens de microscopia eletrônica de transmissão. Nas Figuras 14a e 14c estão apresentadas, respectivamente, as imagens de Magh e Magh-CUR. Os histogramas da distribuição de tamanho obtidos por contagem manual, estão mostrados ao lado das imagens correspondentes, nas Figuras 14b e 14d. A partir destas imagens e do ajuste com uma função de distribuição Log-normal feito nos histogramas pode-se observar que as nanopartículas de ambas as amostras possuem uma morfologia esferoidal com diâmetro médio de $13,2 \pm 0,2$ e $15,2 \pm 0,2$ nm para Magh e Magh-CUR, respectivamente.

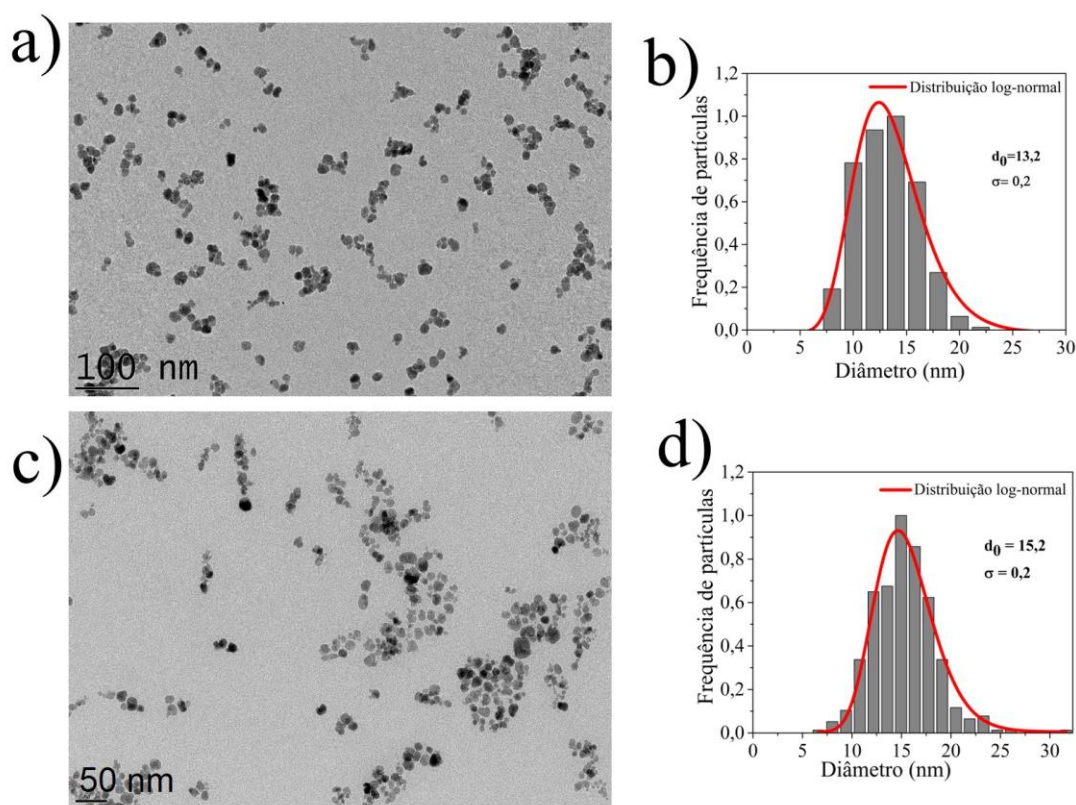


Figura 14: (a) Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão e (b) histograma de distribuição de tamanho da amostra Magh. (c) Imagem obtida por microscopia eletrônica de transmissão e (d) histograma de distribuição de tamanho da amostra Magh-CUR. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Os espectros de infravermelho (FTIR) de Magh, curcumina e de Magh-CUR estão apresentadas na Figura 15a. No espectro de Magh é possível observar uma banda de absorção intensa e alargada em torno de 540 cm^{-1} , que pode ser atribuída ao modo vibracional de estiramento da ligação Fe-O nos sítios octaédricos e tetraédricos da

estrutura cristalina. A maghemita apresenta três bandas de absorção em torno de 630, 590 e 430 cm^{-1} .^{99, 100} A banda alargada em 540 cm^{-1} é composta por outras bandas menores e para visualizá-las fez-se a primeira derivada do espectro na região 625-420 cm^{-1} , que está mostrado no canto esquerdo inferior da Figura 15a. Neste é possível observar três bandas em 616, 520 e 425 cm^{-1} , que são próximas daquelas típicas para a maghemita.⁶¹

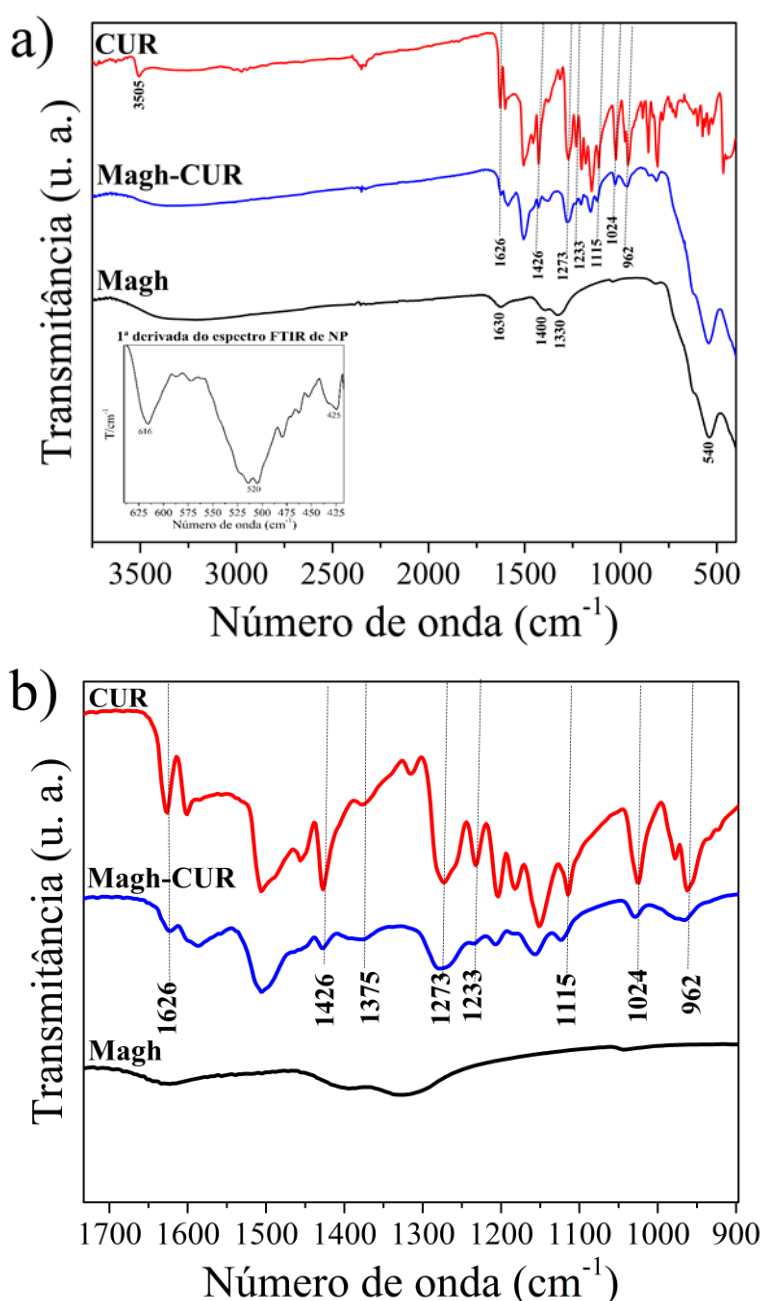


Figura 15: (a) Espectros de FTIR da curcumina, Magh e Magh-CUR. **(b)** Ampliação da região de 1850 a 900 cm^{-1} do FTIR. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

No espectro de Magh, ainda se notam bandas menos intensas em 1630 cm^{-1} , correspondente a vibração de deformação O-H das moléculas de água fissosorvidas e as

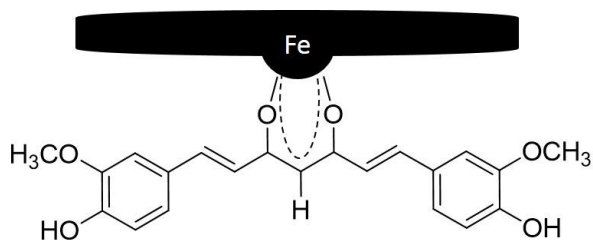
bandas em 1400 e 1330 cm^{-1} podem ser atribuídas aos modos vibracionais dos íons NO_3^- fissorvidos na superfície. A banda alargada na região de 3300 cm^{-1} é uma sobreposição de bandas de menor intensidade, como modos de estiramento de moléculas de água e modos vibracionais de ligações de hidrogênio presente nos grupos hidroxilas superficiais protonados. Estas bandas, em 1630 e 3300 cm^{-1} , estão também presentes no espectro de Magh-CUR.

No espectro da CUR constatam-se algumas bandas características da forma tautomérica enol, uma vez que a CUR sólida é composta unicamente de moléculas nesta forma.¹⁰⁰ As bandas da CUR são características das vibrações: 3505 cm^{-1} estiramento O-H da hidroxila presente no anel aromático; 1626 cm^{-1} estiramento C=O e C=C acoplados através da porção $\alpha\beta$ insaturada em um caráter predominantemente misto; 962 cm^{-1} sobreposição do estiramento C-O e deformação angular C-OH no plano da ligação, do grupo enol; 1273 cm^{-1} deformação angular C-OH no plano da ligação presente nas porções aromáticas; 1233 cm^{-1} deformação angular C-O-H no plano da ligação presente no grupo enol; 1024 cm^{-1} estiramento simétrico de Ar-O-CH₃; 1115 cm^{-1} estiramento O-CH₃; 1426 cm^{-1} deformação angular $^*\text{C}=\text{CH}$ ($^*\text{C}$ representa o carbono do enol) no plano da molécula; 1591 cm^{-1} estiramento C-C nos anéis aromáticos.^{100, 101}

O espectro de Magh-CUR possui novas bandas em comparação com o espectro de Magh, indicando que a conjugação também ocorre por meio de interações químicas e o tipo de interação pode ser inferido comparando-se as diferenças dos espectros da CUR e do conjugado.

Na Figura 15b, ampliação da região 1850-900 cm^{-1} dos espectros da Figura 15a, é possível observar melhor as mudanças que ocorrem em algumas bandas típicas da CUR quando ela está conjugada. As principais mudanças ocorrem nas seguintes banda da CUR: 962 cm^{-1} referente a modos vibracionais do grupo enol, passa a ser menos intensa e mais alargada; 1626 cm^{-1} atribuída a carbonila acoplada com a ligação dupla $\alpha\beta$ insaturada, torna-se pouco intensa e deslocada para 1624 cm^{-1} ; 1233 cm^{-1} referente à deformação angular de C-O-H do grupo enol desaparece; e a banda em 1426 cm^{-1} referente à ligação dupla que ocorre no carbono do grupo enol, torna-se bem menos intensa. Estas mudanças indicam que a curcumina liga-se na maghemita através dos grupos carbonila e enol, possivelmente via formação de ligações coordenadas envolvendo os pares de elétrons da carbonila e do átomo de oxigênio do grupo enol com os átomos de ferro presentes na superfície das nanopartículas. Em trabalhos anteriores, também foi proposto que a

complexação de nanopartículas, como de ZnO e Ag, com a CUR se dá pela complexação dos íons metálicos via função ceto-enol.^{101, 102, 103} A representação desta complexação entre a CUR e as nanopartículas está esquematizada na Figura 16.



Figuras 16: Representação da ligação entre a curcumina e as IONPs. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

4.3 Características das Suspensões

As informações sobre as propriedades de superfície das nanopartículas foram obtidas por meio das medidas de potencial zeta em função do pH das amostras e estão apresentados na Figura 17. As partículas coloidais, quando dispersas em meio aquoso, adquirem cargas elétricas em sua superfície e estas, por sua vez afetam a distribuição de íons e contra-íons na interface da superfície da partícula e a solução, formando assim a dupla camada elétrica. As medidas de mobilidade eletroforética das partículas permite calcular o potencial zeta, que é a diferença de potencial entre a superfície do coloide e o meio de dispersão.

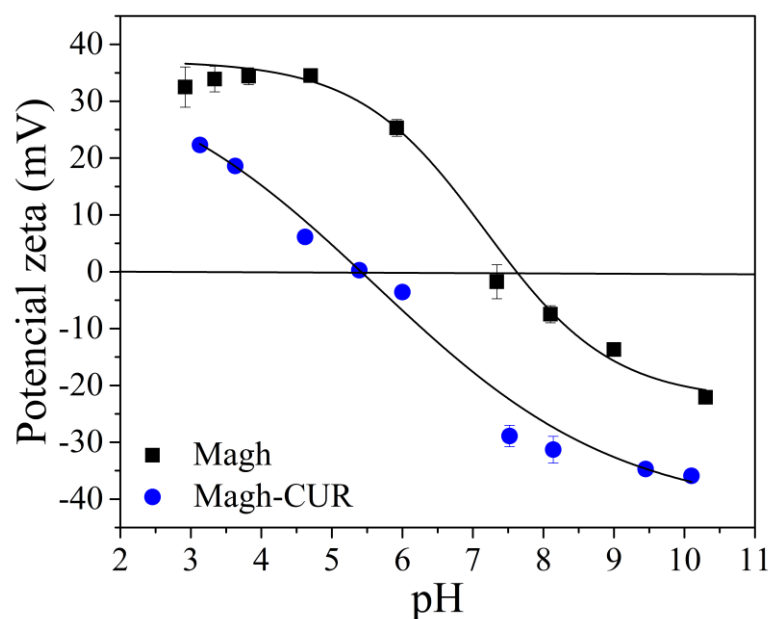


Figura 17: Potencial zeta em função do pH de Magh e Magh-CUR em água deionizada na concentração de 0,05% (m/m), com força iônica ajustada (NaCl, 1 mM). Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

O valor do pH em que o potencial zeta é nulo denomina-se como ponto isoelétrico, no qual há um balanço entre cargas positivas e negativas na superfície. O ponto isoelétrico de Magh foi 7,4, enquanto que para Magh-CUR este valor foi 5,4. De acordo com o intervalo de pH varrido, as suspensões de Magh são mais estáveis em $\text{pH} < 4$, enquanto o conjugado Magh-CUR possui maior estabilidade coloidal em $\text{pH} > 7,4$, pois nesta faixa o potencial zeta apresenta valores inferiores a -30 mV.

Na Figura 18 estão apresentados os espectros de absorção na região do visível da CUR, Magh e do conjugado dispersos em tampão fosfato pH 7,2 a 25 °C.

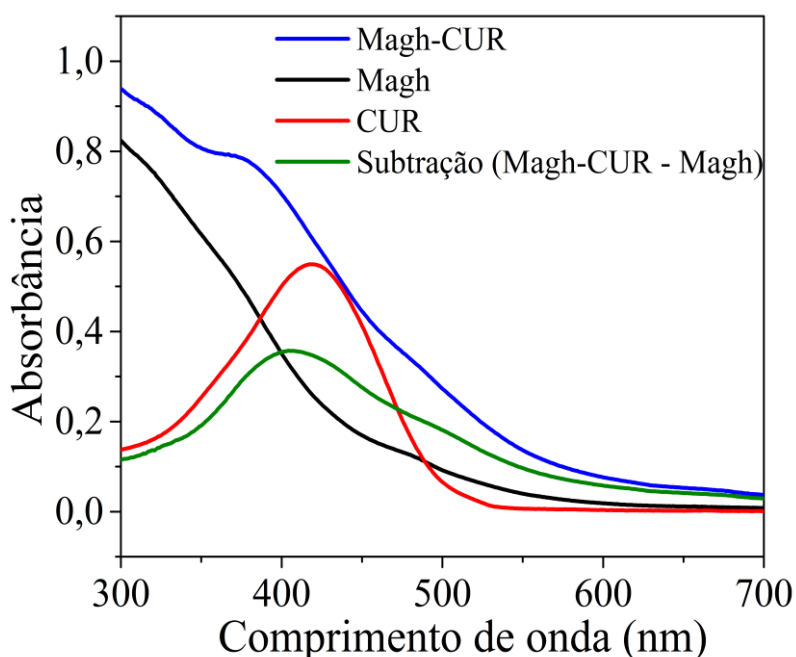


Figura 18: Espectros de absorção na região do visível da curcumina ($4,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$, Magh ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e Magh-CUR ($15 \mu\text{g.mL}^{-1}$) dispersos em tampão fosfato pH 7,2. A curva em verde é referente à subtração dos espectros de Magh-CUR e Magh. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

O espectro da CUR possui uma banda de absorção em $\sim 426 \text{ nm}$, devido ao fato da sua estrutura química possuir elevada alternância entre ligações simples e duplas que permite uma grande deslocalização dos elétrons π entre os grupos aromáticos e a porção $\alpha\text{-}\beta$ insaturada da molécula. Desta maneira estas moléculas de corante conseguem absorver a energia dos fótons por meio das transições eletrônicas do orbital π para o orbital antiligante, π^* .¹⁰⁴

As IONPs possuem uma forte absorção na região do ultravioleta e na região do visível próximo do ultravioleta, que é resultado de transições eletrônicas de transferência de carga e entre orbitais d.⁶¹ Nas transições de transferência de carga a radiação é absorvida quando um elétron do orbital 2p do átomo de oxigênio é transferido para os

orbitais d do íons Fe^{3+} . As transições d-d se dão, principalmente, por causa dos acoplamentos magnéticos entre os íons Fe^{3+} vizinhos na estrutura e pelas interações entre os pares Fe^{3+} - Fe^{3+} . Esta última é a principal responsável pelas absorções das IONPs na região do visível.⁶¹

No espectro de Magh-CUR é possível observar uma forte absorção na região 300-600 nm com uma tendência à formação de banda na região do ultravioleta. Em 360 nm nota-se também um ombro no espectro proveniente da contribuição da CUR. A subtração dos espectros de Magh-CUR e Magh (curva verde) tem um perfil semelhante ao espectro da CUR, porém com o máximo de absorção deslocado para 405 nm. Este deslocamento da absorção para comprimento de onda menores é consistente com a diminuição da deslocalização dos elétrons π provocada pela ligação entre a porção ceto-enol da CUR e os íons ferro superficiais, discutida na seção 4.2 nos resultados do FTIR.

As curvas magnetização em função do campo magnético aplicado das suspensões coloidais das amostras Magh e Magh-CUR (Figuras 19a-b), indicam comportamento superparamagnético, uma vez que estas não apresentam histerese.

As SPIONPs apresentam monodomínios magnéticos cujos momentos magnéticos se alinham na direção do campo aplicado e ao removê-lo a magnetização torna-se nula, logo não há campo coercivo e magnetização remanescente. O comportamento é igual nas duas amostras e a presença de CUR na superfície das nanopartículas não afeta as curvas de magnetização do material.

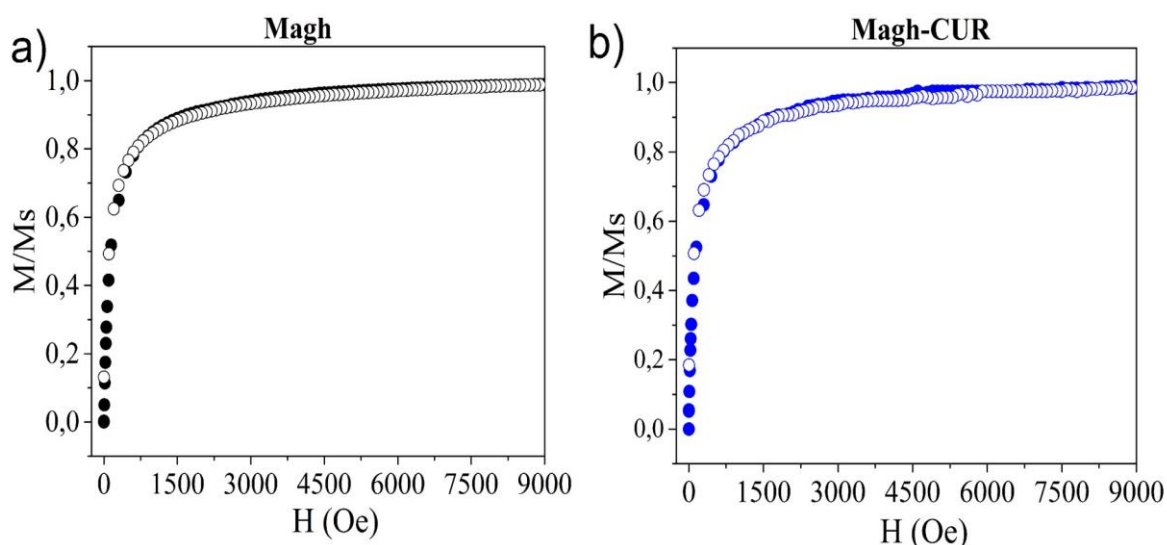


Figura 19: Curvas de magnetização de (a) Magh e (b) Magh-CUR em água deionizada. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

O comportamento das nanopartículas em suspensão coloidal sob aplicação de um campo magnético alternado (CMA) foi investigado através de medidas de hipertermia magnética (HM).

A influência dos parâmetros do CMA na HM das suspensões Magh (12 g.L^{-1} , em pH 4) foi estudada empregando-se quatro combinações frequência do campo (f) e amplitude (H), conforme mostrado na Figura 20, de forma que o seu produto ($f \times H$) $< 5 \times 10^9 \text{ A.m}^{-1}\text{s}^{-1}$. As combinações usadas foram: (n.º 1) $f=280 \text{ kHz}$ e $H=15,9 \text{ kA.m}^{-1}$; (n.º 2) $f=420 \text{ kHz}$ e $H=10,6 \text{ kA.m}^{-1}$; (n.º 3) $f=280 \text{ kHz}$ e $H=10,6 \text{ kA.m}^{-1}$; (n.º 4) $f=420 \text{ kHz}$ e $H=5,3 \text{ kA.m}^{-1}$.

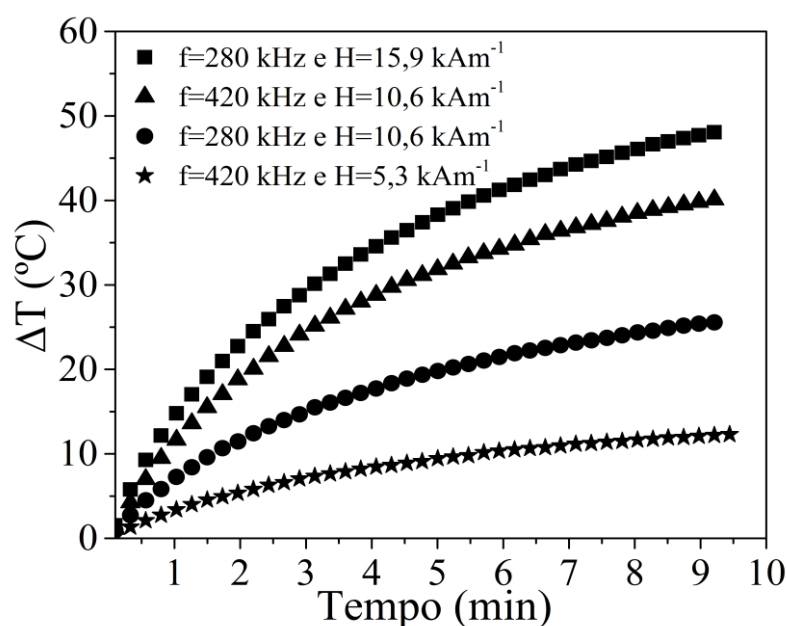


Figura 20: Curva de hipertermia magnética das suspensões coloidais de Magh (12 g.L^{-1}), em pH 4, e em diferentes combinações de campo e frequência. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Na Figura 20 pode-se observar que o parâmetro do CMA influencia fortemente a HM, pois para uma mesma concentração de Magh a variações de temperaturas (ΔT) após 9,5 min de aplicação do CMA variou significativamente.

Esta influência também pode ser avaliada através da perda específica de calor (SLP) das amostras cujo valor indica o poder de dissipação térmica por massa de material magnético. O SLP foi calculado usando a Equação 5. Os valores de SLP e ΔT estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4: Valores de SLP e ΔT das suspensões coloidais de Magh (12 g.L^{-1}) em diferentes parâmetros de CMA.

Nº	f (kHz)	H (kA m ⁻¹)	f x H (x10 ⁹ Hz Am ⁻¹)	ΔT (°C)	SLP (W.g ⁻¹)
1	280	15,9	4,4	48	126 ±1
2	420	10,6	4,4	40	90 ±3
3	280	10,6	3,0	26	57 ±3
4	420	5,3	2,2	12	29 ±3

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

As combinações n.º 1 e 2 na Tabela 4 têm o produto $f \times H = 4,4 \times 10^9 \text{ A.m}^{-1}\text{s}^{-1}$, enquanto que este produto para as combinações n.º 3 e 4 são 3,0 e $2,2 \times 10^9 \text{ A.m}^{-1}\text{s}^{-1}$, respectivamente. Isto ocasiona uma grande diminuição do SLP quando se comparam as duas primeiras combinações com as demais. Logo, o valor do SLP é proporcional ao produto $f \times H$. Todavia, as combinações de mesmo produto, como a n.º 1 e 2 também podem gerar valores de SLP diferentes, caso os parâmetros de amplitude e frequência sejam diferentes.

O valor de SLP é proporcional tanto à frequência quanto à amplitude do CMA aplicado, porém, a sua dependência em relação a amplitude é ao quadrado.⁹² Por isso, a combinação n.º 1 gera um valor de SLP maior que a n.º 2 e por esta razão ela foi escolhida para realizar as outras medidas de HM e os ensaios microbiológicos empregando o CMA.

Nas Figuras 21a-b estão, respectivamente, apresentadas as curvas de HM das suspensões coloidais de Magh e Magh-CUR em diferentes concentrações, obtidas empregando o CMA de $f=280 \text{ kHz}$ e $H=15,9 \text{ kA.m}^{-1}$.

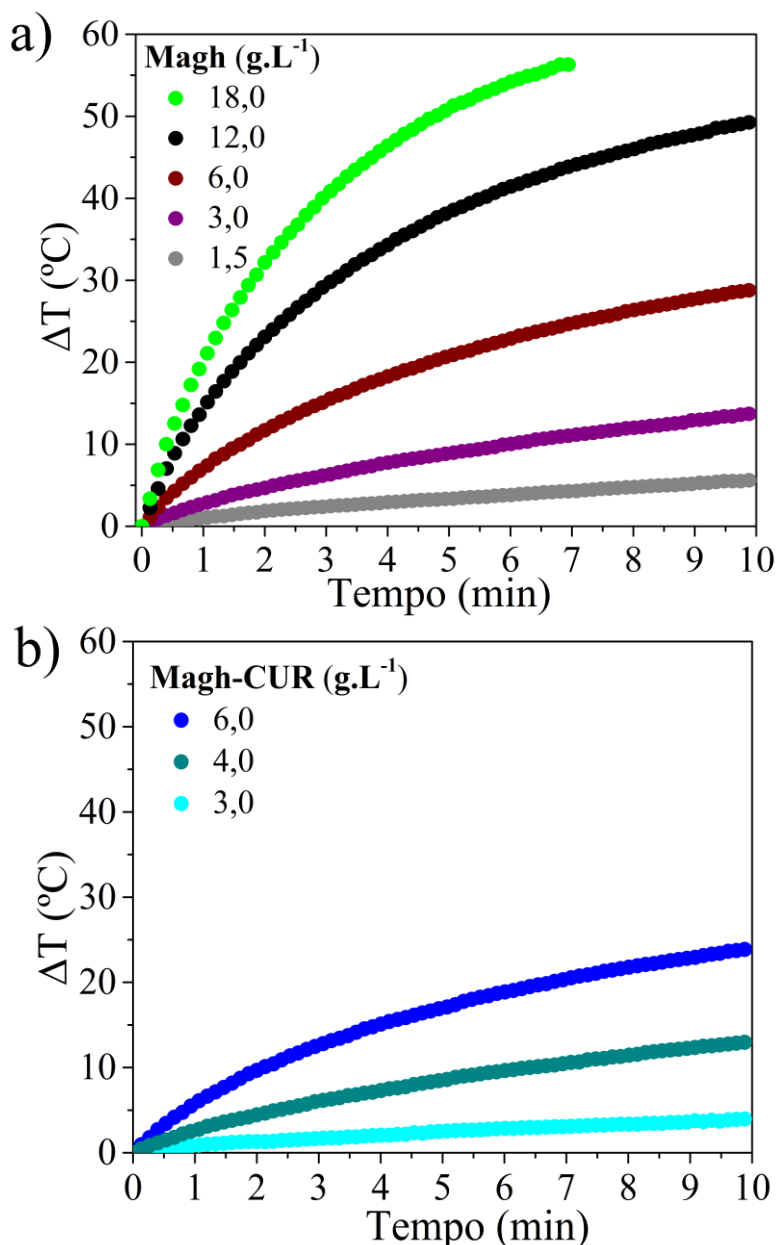


Figura 21: Curvas de hipertermia magnética das suspensões coloidais de **(a)** Magh (pH 4) e **(b)** Magh-CUR (pH 7,2) em diferentes concentrações, obtidas com aplicação de CMA com amplitude máxima de campo igual a $15,9 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$ e frequência de 280 kHz. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Os valores de ΔT referentes à variação de concentração de Magh e Magh-CUR (Tabela 5) são proporcionais a concentração de nanopartículas no meio, enquanto que o valor de SLP não possui esta mesma dependência. As duas concentrações mais baixas possuem SLP iguais, porém estes são menores que os valores referentes às três concentrações mais altas, que por sua vez possuem valores próximos entre si. A dependência do SLP e ΔT de Magh-CUR também é proporcional a concentração de partículas.

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 $f = 280 \text{ kHz}$).

Nº	Concentração ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	ΔT ($^{\circ}\text{C}$) em 10 min de CMA	SLP ($\text{W}\cdot\text{g}^{-1}$)
1	Magh (1,5)	6	92 ± 2
2	Magh (3,0)	14	92 ± 2
3	Magh (6,0)	29	125 ± 9
4	Magh (12,0)	49	126 ± 1
5	Magh (18,0)	57*	122 ± 1
6	Magh-CUR (3,0)	4	25 ± 2
7	Magh-CUR (4,0)	13	57 ± 1
8	Magh-CUR (6,0)	24	92 ± 5

*em 7 min.

Fonte: elaborada pelo autor, 2019.

Ainda não há um consenso na literatura sobre a influência da concentração de IONPs no valor de SLP, pois os estudos são difíceis de serem comparados, tanto pela falta de informações detalhadas sobre o procedimento experimental quanto pela dependência do SLP com uma grande variedade de fatores experimentais (amplitude de campo, frequência de campo, tipo de aparato para gerar o CMA) e características das nanopartículas (tamanho, forma, meio de dispersão, anisotropia, agregação).⁸³ Entretanto, é bem aceito que a dependência do valor de SLP com a concentração surge devido à interações dipolares interpartículas, que são favorecidas com a diminuição da distância entre as partículas à medida que a concentração aumenta.^{83, 92} Em concentrações elevadas, as IONPs, quando submetidas a um CMA, podem formar nano-montagens com diferentes formas, o que por sua vez pode acarretar mudanças na eficiência da HM quando comparado com suspensões coloidais bem dispersas e com baixas concentrações de nanopartículas.^{83, 92, 105}

Quando se compara a curva de aquecimento do conjugado e Magh na mesma concentração ($6 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) na Tabela 5 nota-se que o valor de ΔT para o conjugado é 5°C menor que o de Magh. A diferença é mais significativa no caso do SLP, uma vez que Magh e Magh-CUR possuem valores de SLP de 125 e $92 \text{ W}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Isto pode estar relacionado com o surgimento de interações atrativas hidrofóbicas entre as moléculas de curcumina presente na superfície das nanopartículas, o que por sua vez pode dificultar a rotação destas nanopartículas no meio circundante e, por consequência, interferir no processo de dissipação de energia.

4.4 Liberação da Curcumina *in vitro*

Os ensaios de liberação da curcumina foram realizados em solução tampão fosfato pH 7,2 em diferentes temperaturas durante 24 h (Figura 22). A quantidade de CUR liberada após 24 h foi de 9,7, 12,8 e 14 % nas temperaturas de 25, 37 e 45 °C, respectivamente. Esta liberação pode ser atribuída a CUR não ligada covalentemente na superfície das nanopartículas. A dependência da liberação com a temperatura é interessante para estes conjugados, pois, uma vez que são SPIONPs, existe a possibilidade de induzir a liberação pelo aquecimento local provocado pela aplicação de um CMA. O controle de liberação de um fármaco por intermédio um CMA em nanocarreadores magnéticos já foi explorado por alguns trabalhos.^{79, 106}

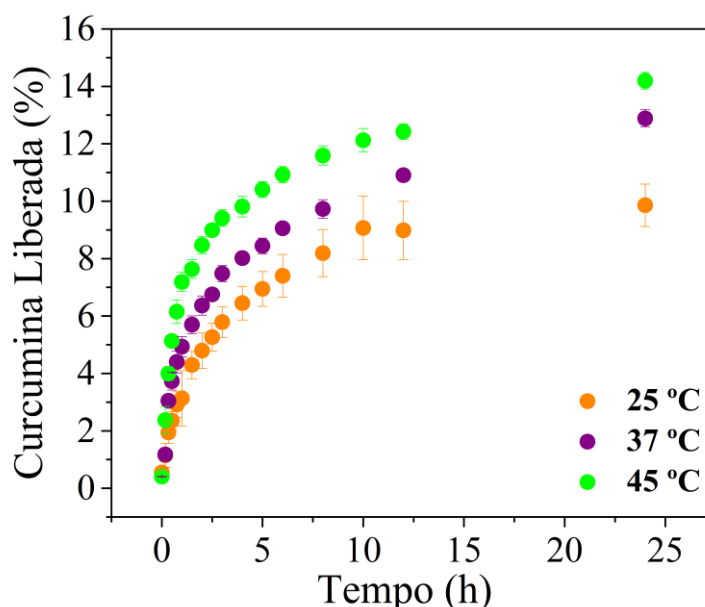


Figura 22: Liberação da curcumina a pH 7,2 num meio aquoso com 0,5 % m/m tween 80 em diferentes temperaturas. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

4.5 Ensaios Microbiológicos em Fase Planctônica

Inicialmente, foram realizados experimentos no escuro e com a aplicação de luz LED, empregando como fotossensibilizador a CUR dispersa em meio aquoso com 25% de etanol, sem e com a aplicação de luz (Figuras 23a-d). Na Figura 23a pode-se observar que a CUR nas concentrações de 5, 20 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ não apresentou nenhum tipo de toxicidade para o *Staphylococcus aureus* nos experimentos no escuro. Isto fica evidente ao comparar as barras referentes a tais concentrações com a barra do grupo controle de crescimento (CC). Nas Figuras 23b e 23c estão apresentados os resultados dos grupos controle de luz (CL) e controle de veículo (CV) para as duas maiores doses de luz, o que

permite avaliar a toxicidade da irradiação e do meio de dispersão do FS, respectivamente, sobre o *S. aureus*. Como não houve diferença estatística entre os grupos CC, CL e CV nas duas doses, pode-se afirmar que as doses de luz e o meio de dispersão da CUR, nas condições experimentais empregadas, não resultaram em qualquer toxicidade para a bactéria.

Os resultados dos experimentos empregando-se a CUR como FS, em diferentes concentrações, e irradiação com luz LED azul, nas doses de luz 12,5, 6,25, 3,12 J.cm⁻² e irradiância de 107 mW.cm⁻², estão mostrados nas Figuras 23b-d.

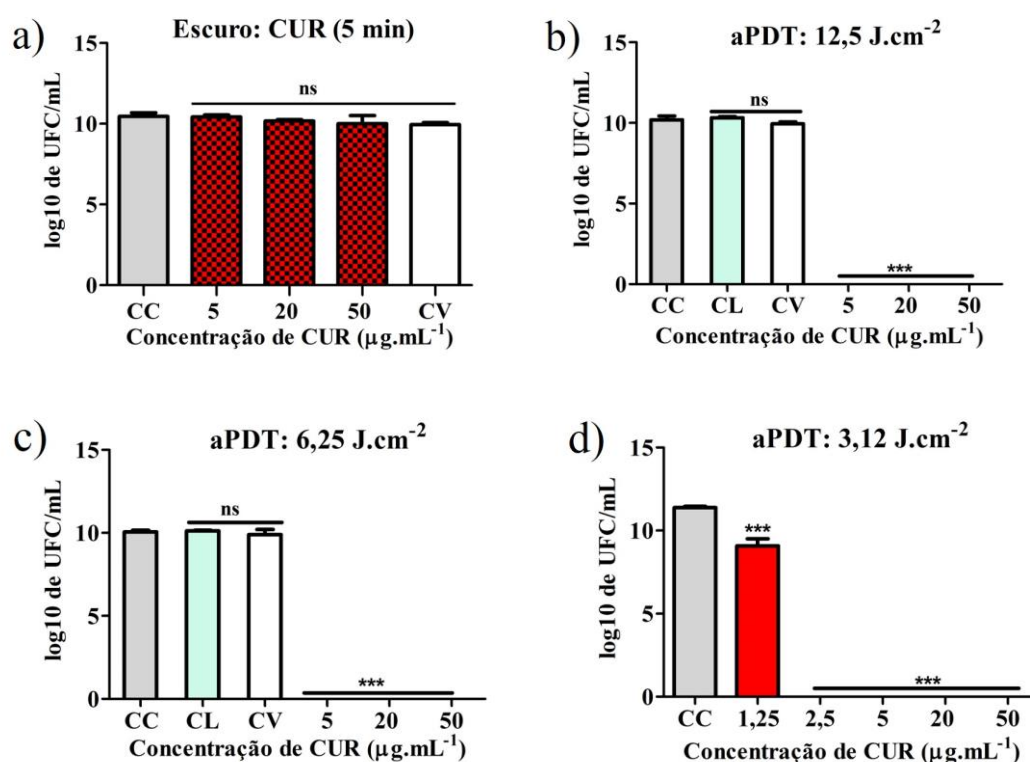


Figura 23: Suspensões de *S. aureus* incubadas por 5 min com diferentes concentrações de CUR, dispersa em meio aquoso com 25% etanol, na condição sem irradiação (escuro) (a), e com irradiação LED azul nas doses de 12,5 J.cm⁻² (b), 6,25 J.cm⁻² (c) e 3,12 J.cm⁻² (d). As abreviações CC, CL e CV representam os grupos controle de crescimento, luz e de veículo, respectivamente. O ns indica que não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo CC. ANOVA one-way, com pós teste de Tukey, na qual ***($p < 0,001$). Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Para as três doses de luz testadas houve redução total da carga bacteriana, nas concentrações de 5, 20 e 50 µg.mL⁻¹ de CUR. Na dose de 3,12 J.cm⁻² também houve toxicidade na concentração de 2,5 µg.mL⁻¹, enquanto que para a concentração de 1,25 µg.mL⁻¹ houve uma redução de 2,3 do logaritmo de base 10 da quantidade de unidades formadoras de colônia das bactérias sobreviventes por mililitro, log₁₀ de UFC/mL. Portanto, a concentração de 1,25 µg.mL⁻¹, na dose de luz de 3,12 J.cm⁻², foi considerada

como a concentração inibitória mínima (MIC, do inglês *minimal inhibitory concentration*). A determinação da MIC para o FS testado no mesmo conjunto de parâmetros de irradiação é a forma mais adequada para expressar a eficiência da PDT.¹⁰⁷ Todavia, a redução em $\log_{10}$ é considerada como um efeito antimicrobiano quando a redução da carga microbiana ultrapassa 3 logs (cerca de 99,9% de morte).

As toxicidades apontadas nestes experimentos com irradiação, e que não ocorreram nos experimentos realizados no escuro, indicam que a redução da carga bacteriana foi proveniente da ação fotodinâmica da CUR. O modo de ação da CUR como FS é atribuída à perda da integridade da membrana celular dos microrganismos por causa da produção de EROs.

Diversos estudos relataram que a CUR pode atuar como um FS pertinente em combinação com a luz azul, contra *Staphylococcus aureus*¹⁰⁸ e outras bactérias Gram-positivas (p. ex. *Propionibacterium acnes*⁴², *Enterococcus faecalis*¹⁰⁹) e Gram-negativas (p. ex. *Escherichia coli*¹¹⁰) em fase planctônica. A CUR também pode promover a inativação fotodinâmica de várias espécies de bactérias na forma de biofilmes (organização microbiana mais resistente à inativação), empregando concentrações de CUR e dosagens de luz maiores que aquelas usadas na inativação dos microrganismos em fase planctônica.^{20, 41}

Ribeiro *et al.* (2013)¹⁰⁸ relataram que a inativação total de *S. aureus* susceptíveis ao antibiótico metilicina (MSSA, do inglês *methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*) foi conseguida com uma concentração de $1,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CUR, diluída em 10% dimetilsufóxido (DMSO), e uma irradiação com luz LED azul com dose de 18 J.cm^{-2} (~ 6 vezes maior que a menor dose empregada neste trabalho). Além disso, os resultados obtidos pelos autores evidenciaram que a ação fotodinâmica contra estas bactérias foi diretamente proporcional à concentração da CUR. Este efeito foi semelhante ao observado neste trabalho, uma vez que na menor dose de luz a diferença entre a MIC, $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e a concentração que promoveu total redução bacteriana, $2,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$, foi de apenas $1,25 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Cabe ressaltar que na maioria das vezes a comparação entre diferentes estudos de PDT envolve um certo grau de dubiedade, por mais que se comparem estudos que envolvem o mesmo FS e a mesma espécie patogênica. Esta imprecisão está relacionada com a falta de padronização dos protocolos de PDT, uma vez que muitos parâmetros experimentais (p. ex. fonte de luz usada, dose de luz, tempo de pré-incubação, carga

microbiana e pureza, concentração e meio de dispersão do FS) influenciam no resultado dos experimentos.⁴¹ Os fatores relacionados ao FS, como o meio de dispersão, tornam-se ainda mais importante no caso de FSs que são instáveis em meios aquosos e que possuem propriedades ópticas fortemente dependentes do meio de dispersão, como é o caso da curcumina.^{34, 39, 98, 111}

A capacidade de Magh atuar como FS também foi avaliada. Nas Figuras 24a-b estão apresentados os resultados dos experimentos no escuro e com irradiação (dose de luz de $12,5 \text{ J.cm}^{-2}$), respectivamente, incubando-se as bactérias com Magh por 5 min. Em ambas condições, nenhuma concentração testada promoveu toxicidade, indicando que Magh não apresenta qualquer ação fotodinâmica ou qualquer efeito antimicrobiano nos 5 min de incubação. Atualmente, alguns estudos apontam que nanopartículas de óxidos metálicos, tais como o dióxido de titânio (TiO_2) e óxido de zinco (ZnO), podem promover ação fotodinâmica sob irradiação de luz na região do ultravioleta devido ao fato de estes materiais serem semicondutores.^{112, 113}

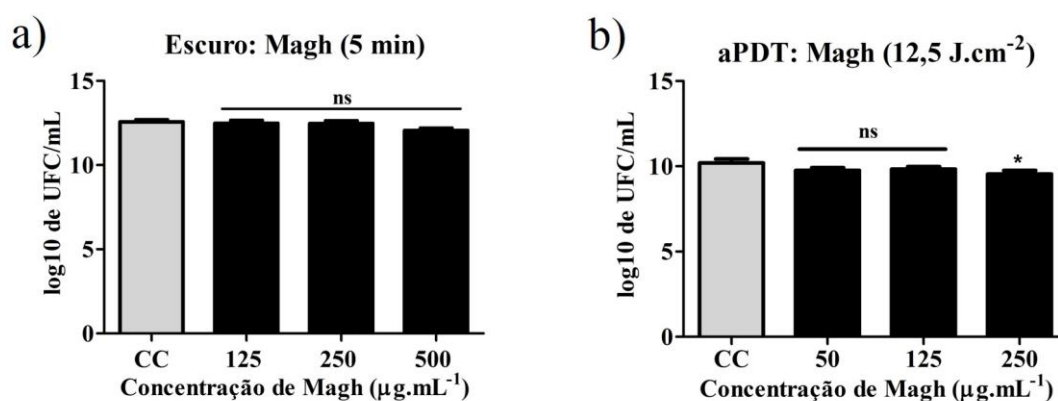


Figura 24: Suspensões de *S. aureus* incubadas por 5 min com diferentes concentrações de Magh, na condição sem irradiação (escuro) **(a)**, e com irradiação LED azul na dose de $12,5 \text{ J.cm}^{-2}$ **(b)**. A abreviação CC representa o grupo controle de crescimento. O ns indica que não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo CC. ANOVA *one-way*, com pós teste de Tukey, na qual $^*(p < 0,05)$. Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

O conjugado Magh-CUR e Magh foram avaliadas como agentes antimicrobianos num experimento realizado no escuro, no qual as bactérias foram incubadas com essas nanopartículas por 24 h (Figura 25). A Magh não promoveu redução bacteriana em nenhuma concentração testada, enquanto que o conjugado nas concentrações de 1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ promoveu reduções em log₁₀ de 1,9, 2,0 e 2,5, respectivamente.

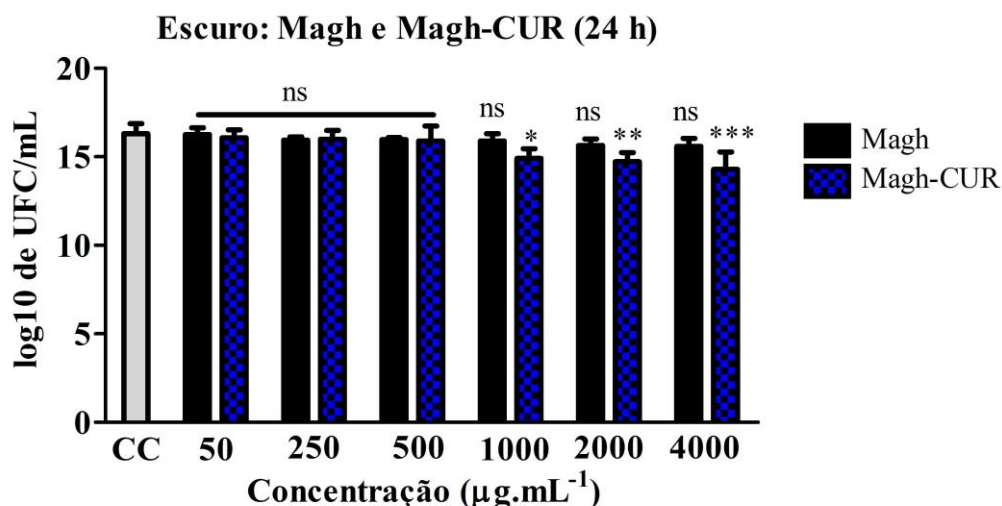


Figura 25: Suspensões de *S. aureus* incubadas por 24 h com diferentes concentrações de Magh e Magh-CUR no escuro. A abreviação CC representa o grupo controle de crescimento. O ns indica que não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo CC. ANOVA *one-way*, com pós teste de Tukey, na qual * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) e *** ($p < 0,001$). Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

Os resultados para Magh estão de acordo com alguns estudos. Masadeh *et al.* (2015) relataram que a maghemita (tamanho médio de partícula ~ 45 nm) na concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não apresentou qualquer toxicidade para *S. aureus* em suspensão após 24h de incubação.¹¹⁴ Azam *et al.* (2002) também apontaram que a maghemita (tamanho médio de partícula ~ 28 nm) foi muito pouco eficiente na inativação de *S. aureus*, tendo uma ação antimicrobiana 4 vezes inferior àquela promovida pelo antibiótico tetraciclina.¹¹⁵ Em contrapartida outros estudos relataram que as IONPs sem revestimento podem atuar como antimicrobiano. Ismail *et al.* (2015) demonstraram, a partir do MIC determinado por um método de difusão em ágar, que IONPs ($\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ com tamanhos entre 50–110 nm) foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus*.¹¹⁶

Os dados sobre o efeito antimicrobiano das IONPs contra as cepas de *S. aureus* são escassos e contraditórios, o que aponta para uma necessidade de estudos mais completos e criteriosos a respeito da toxicidade destes nanomateriais contra estas bactérias em específico, nos quais possa ser avaliado a influência do tamanho, forma, carga de superfície e método de síntese numa possível atividade antimicrobiana. Contudo, na literatura há trabalhos mais concisos que demonstram que as IONPs apresentaram atividade antimicrobiana contra esta bactéria quando foram revestidas com álcool polivinílico¹¹⁷, quitosana¹¹⁸, tioglicerol¹¹⁹, ácido oleico¹²⁰, como uma estratégia para melhorar a penetração das nanopartículas nas paredes celulares das bactérias.¹²¹

A pequena redução da carga bacteriana promovida por Magh-CUR nas três maiores concentrações testadas, 1000, 2000 e 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, deve estar associada a conjugação da CUR na superfície das IONPs melhorando, possivelmente, a interação entre estas nanopartículas e o envelope celular das bactérias. A CUR possui atividade antimicrobiana no escuro contra *S. aureus* baseada na perturbação da integridade da membrana bacteriana, uma vez que ela consegue se ligar ao peptidoglicano, que é o principal constituinte das paredes celulares de bactérias Gram-positivas.¹²²

Portanto, acredita-se que a CUR ligada nas IONPs facilitou a interação destas nanopartículas com as paredes das células microbianas. Isto por sua vez pode causar danos para as bactérias devido às alterações estruturais da parede celular e acúmulo no espaço periplasmático, ou até mesmo penetração no citoplasma bacteriano, o que pode acarretar no vazamento do conteúdo celular.¹²³

Além disso, a penetração pode aumentar o dano causado por EROs cuja ação é limitada ao local de produção, pois o mecanismo de toxicidade de IONPs mais aceito é atribuída ao estresse oxidativo causado pela geração destas espécies reativas.^{124, 125} Estas nanopartículas podem ser degradadas por hidrólise em estruturas celulares (endossomos ou lisossomos) e os íons ferro provenientes da degradação são transportados para o citosol, onde podem catalisar a conversão do peróxido de hidrogênio, presente no interior da célula, em radicais hidroxilo ($\bullet\text{OH}$), que são extremamente tóxicos para moléculas biológicas. Esta reação é chamada de Fenton.¹²³

Na Figura 26 estão apresentados os resultados referentes a terapia fotodinâmica, empregando a dose de 3,12 J.cm^{-2} com irradiância de 107 mW.cm^{-2} , e usando como FS o conjugado Magh-CUR nas concentrações de 125 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nesta mesma figura, também está apresentado o resultado do experimento no escuro, empregando a concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

A partir destes resultados observa-se que as duas concentrações utilizadas de Magh-CUR promoveram total redução bacteriana, enquanto que no experimento conduzido no escuro não apresentou redução. Isto indica que de fato, a redução promovida se deve à ação fotodinâmica do conjugado. Isto evidencia que a irradiação destes conjugados com luz azul torna a sua ação antimicrobiana extremamente eficaz, uma vez que nos experimentos sem irradiação (Figura 25) o Magh-CUR na concentração de 4000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (~16 vezes maior que a concentração máxima testada no aPDT) promoveu uma redução da carga bacteriana muito pequena. Além disso, a inativação no aPDT foi conseguida em

apenas 30 s de irradiação, enquanto que nos experimentos sem irradiação as cepas foram incubadas com os Magh-CUR por 24 h.

Além disso, a conjugação de CUR na superfície das IONPs, aparentemente, não afeta a sua atividade fotodinâmica, pois uma a CUR na concentração de $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (referente a $\sim 32\%$ de CUR presente em $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Magh-CUR) também promoveria inativação total da carga bacteriana, tendo em vista que entre 2,5 e $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de CUR usando a dose de $3,12 \text{ J.cm}^{-2}$ a inativação foi completa (Figura 23d).

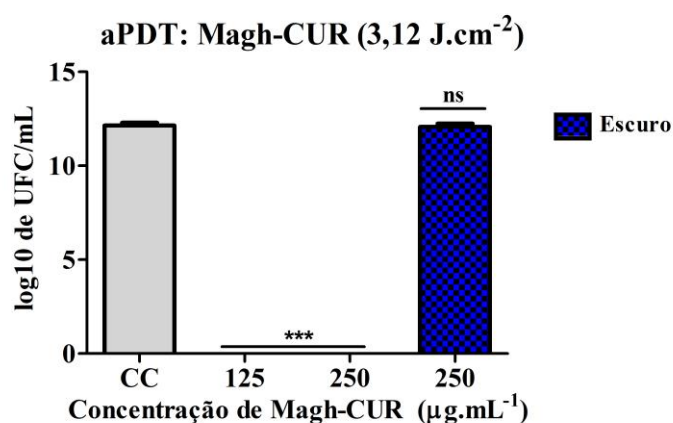


Figura 26: Suspensões de *S. aureus* incubadas por 5 min com diferentes concentrações dos conjugados Magh-CUR com e sem irradiação LED azul na dose de $3,12 \text{ J.cm}^{-2}$. A abreviação CC representa o grupo controle de crescimento. O ns indica que não houve diferença estatística significativa em relação ao grupo CC. ANOVA *one-way*, com pós teste de Tukey, na qual ***($p < 0,001$). Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A conjugação de fotossensibilizadores em IONPs é uma abordagem recente que visa diminuir a agregação dos FSs em meios aquosos e ressignificar o uso terapêutico desses nanomateriais. A grande maioria dos trabalhos que investigaram tal abordagem empregaram FSs porfirínicos.^{51, 53, 54}

Por fim, Magh-CUR foi avaliado contra *S. aureus* em experimentos de HM, empregando-se CMA com amplitude máxima (H) igual a $15,9 \text{ kA.m}^{-1}$ e frequência (f) de 280 kHz, durante 20 nm, nas concentrações de 4000 e $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, que estão apresentados nas Figuras 27a e 27b, respectivamente.

Primeiramente, realizou-se um experimento de controle para assegurar que o CMA não causaria toxicidade à bactéria, denominado grupo controle de campo (CH), no qual a suspensão de bactéria sem a presença de Magh-CUR foi submetida ao CMA empregado no experimento de HM. Na Figura 27a pode-se observar que o CMA não causou redução

da carga bacteriana, pois o grupo CH não teve diferença estatística quando comparado com o grupo CC.

Outro experimento preliminar realizado foi o controle negativo (CN), no qual a bactéria ficou em contato com Magh-CUR nas mesmas concentrações empregada nos experimentos com CMA, porém no escuro e sem a aplicação do CMA. No experimento com a concentração de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a redução foi de $2,4 \log_{10}$ de UFC/mL (Figura 27a), enquanto que para $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ não houve diferença estatística em relação ao grupo CC (Figura 27b).

Nos experimentos com aplicação de CMA empregando $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de Magh-CUR houve uma redução de $\sim 2 \log_{10}$, indicando que o aumento de temperatura, $\sim \Delta T = 13^\circ\text{C}$ alcançado durante os 10 min iniciais do CMA, não causou morte bacteriana, uma vez que a redução alcançada foi menor que aquela do experimento de CN. Logo, a redução observada foi de fato em decorrência da concentração de Magh-CUR e não pela elevação da temperatura local gerada pela HM.

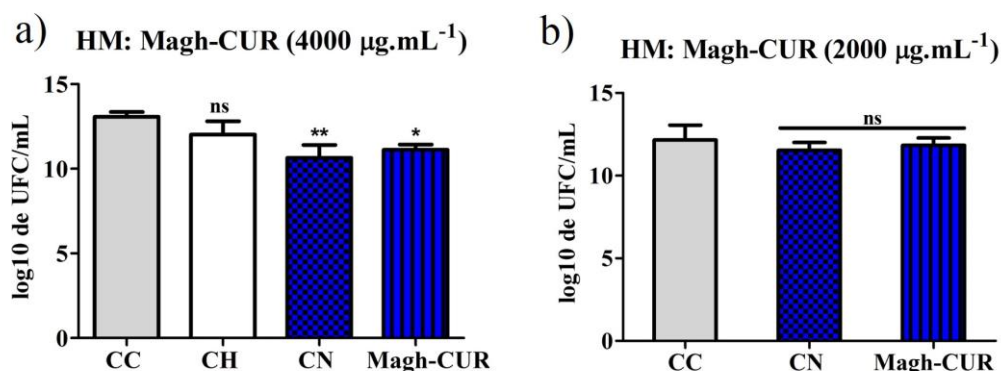


Figura 27: Suspensões de *S. aureus* incubadas por 20 min com os conjugados Magh-CUR nas concentrações de $4000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (a) e $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (b) com aplicação de um CMA ($H = 15,9 \text{ kA.m}^{-1}$ e $f = 280 \text{ kHz}$) durante 20 min. As abreviações CC, CH e CN representam os grupos controle de crescimento, campo e negativo, respectivamente. O ns indica que não houve diferença estatística em relação ao grupo CC. ANOVA one-way, com pós teste de Tukey, na qual * ($p < 0,05$) e ** ($p < 0,01$) Fonte: elaborado pelo autor, 2019.

A elevação de temperatura pode aumentar a permeabilidade de células procarióticas, principalmente na forma de biofilmes. O aquecimento pode romper a integridade estrutural dos biofilmes, e isto pode beneficiar a sua remoção por processos físicos, bem como aumentar a eficácia de antibióticos.¹²⁶

Nguyen *et al.* (2015) demonstraram que core/shell de magnetita melhorou a dispersão de biofilmes de *Pseudomonas aeruginosa* quando submetidas a um CMA ($B = 6,5 \text{ T}$ e $f = 196 \text{ kHz}$) por 20 min e o tratamento combinado da HM com o antibiótico

gentamicina aumentou cerca 3,2 e 4,1 vezes a eficácia do tratamento contra as bactérias em fase planctônicas e biofilme, respectivamente, comparadas a gentamicina isolada.¹²⁷

Em outro estudo, Kim *et al.* (2013)¹²⁸ relataram que o uso de IONPs (tamanho médio de 100 nm) ligadas a um anticorpo promoveu uma redução de 3 log em *S. aureus* na forma de biofilme após 3 min de aplicação de CMA ($H = 40 \text{ kA.m}^{-1}$ e $f = 2100 \text{ kHz}$). Os autores apontaram que o CMA nas condições mencionadas gerou um SLP de 900 W.g^{-1} . Os parâmetros de CMA empregados pelos autores deste trabalho são extremamente elevados e ultrapassa ~17 vezes o limite recomendado para o produto $H \times f = 5 \times 10^9 \text{ A./m.s}$ proposto por Hergt e Dutz.⁹⁰

Apesar da elevação de temperatura causada pela HM de Magh-CUR não ter sido suficiente para promover redução da carga bacteriana, o efeito de aquecimento pode trazer benefícios para o tratamento de infecções por PDT. Os tecidos cutâneos podem ter elevação e diminuição de temperatura, dependendo da presença de infecções e do estágio de cicatrização da ferida, o que afeta a atividade de fibroblastos e neutrófilos, resultando no prolongamento do tempo para o fechamento da ferida.¹²⁶ Xia *et al.* (2000) demonstraram que o aquecimento pode estimular o crescimento de fibroblastos em condições miméticas.¹²⁹ O tratamento de infecções mais profundas (p. ex. úlceras e queimaduras) possuem, geralmente, uma má vascularização, o que diminui a temperatura da área infectada.¹²⁶ A hipertermia melhora a vascularização e a oxigenação do tecido, que são extremamente importantes na PDT, e por consequência, facilita o tratamento das infecções e a cicatrização do tecido infectado.¹²⁶ Portanto, a combinação do PDT com a HM pode trazer muitas vantagens e alguns estudos relataram sinergismo nesta combinação terapêutica.^{49, 50, 130}

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 esferoidal 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 DEMAÏN, 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 LACAVA, 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.