

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo deste documento será disponibilizado somente a partir de 21/02/2027.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**

Mestrado Acadêmico em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

VITOR MELO BRANDÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE INTERNALIZAÇÃO
CELULAR DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM
QUERATINÓCITOS**

BOTUCATU-SP

2025



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE
MESQUITA FILHO”**



Mestrado Acadêmico em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO

VITOR MELO BRANDÃO

**CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE INTERNALIZAÇÃO
CELULAR DE NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS EM
QUERATINÓCITOS**

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de Biociências de Botucatu, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas.

Orientador: Prof. Dr. José Ricardo
de Arruda Miranda

BOTUCATU-SP

2025

B817c Brandão, Vitor Melo
Caracterização do Perfil de Internalização Celular de
Nanopartículas Magnéticas em Queratinócitos / Vitor Melo Brandão.
-- Botucatu, 2025
48 p. : tabs., fotos

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu
Orientador: José Ricardo de Arruda Miranda

1. BAC. 2. EPR. 3. Queratinócitos. 4. Nanopartículas Magnéticas.
5. Cultura Celular. I. Título.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Botucatu



ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE VITOR MELO BRANDÃO, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOMOLECULARES E FARMACOLÓGICAS, DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 21 dias do mês de agosto do ano de 2025, às 8h, por meio de Videoconferência, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de VITOR MELO BRANDÃO, intitulada **Caracterização do perfil de internalização celular de nanopartículas magnéticas em queratinócitos**, sob orientação do Prof. Dr. José Ricardo de Arruda Miranda. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA (Orientador(a) - Participação Virtual) do(a) Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. OSWALDO BAFFA FILHO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Física / Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto - USP, Pós-Doutorando MATHEUS NAIA FIORETTO (Participação Virtual) do(a) Departamento de Biologia Estrutural e Funcional / Instituto de Biociências de Botucatu - Unesp. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: _ _ _ _ _ aprovado _ _ _ _ _ . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.



Documento assinado digitalmente
JOSE RICARDO DEARRUDA MIRANDA
Data: 21/08/2025 12:00:14-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. JOSÉ RICARDO DE ARRUDA MIRANDA

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Wagner e Cássia, e irmã Clara, pela dedicação, apoio incondicional e por acreditarem em mim em todas as etapas da minha trajetória. Pela paciência, incentivo e amor, que foram fundamentais para que eu pudesse chegar até aqui. Este trabalho é também fruto do exemplo de esforço, ética e perseverança que sempre me transmitiram.

À Mariana, pelo apoio constante, paciência e compreensão durante todos os momentos desta jornada. Pelo incentivo diário, pelas palavras de motivação e pela presença ao meu lado, que foram essenciais para que eu pudesse superar desafios e alcançar esta conquista.

Aos meus grandes amigos, Felipe, José, Matheus e Vitor, estamos juntos desde sempre e carrego comigo com muito carinho, cada momento que compartilhamos, conversas, desafios, problemas, risadas, encontros (que não acontecem tanto quanto deveriam) e tantos outros momentos que tornaram essa jornada mais leve.

Aos meus grandes amigos (agora de Botucatu), Mateus, Gustavo, João Miguel e Fernando, conviver com vocês foi fundamental para que esse percurso fosse não apenas mais divertido, mas também repleto de aprendizados, apoio e companheirismo.

Ao meu orientador, Professor Titular José Ricardo de Arruda Miranda, pela paciência, dedicação, ensinamentos e conselhos, incontáveis ajudas e esclarecimentos e principalmente pela oportunidade de tanto aprendizado, crescimento pessoal e profissional ao longo dos últimos (quase) 5 anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio financeiro ao longo dos últimos 2 anos.

Por fim, ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biomoleculares e Farmacológicas (PPG-CBF), pela oportunidade de desenvolvimento desse trabalho e de tantas outras oportunidades extracurriculares que engrandeceram meu aprendizado e desenvolvimento pessoal e profissional.

*“Twinkle winkle little spin
Are you single or are you twin?
Are you real or are you false?
How I crave your resonant pulse”*

John A. Weil

RESUMO

Dentre as vias de administração de fármacos, a via tópica oferece vantagens, como por exemplo evitar o metabolismo de primeira passagem e possibilitar a aplicação direcionada à pele. Contudo, barreiras estruturais, como o estrato córneo, limitam a penetração de fármacos, motivando o desenvolvimento de sistemas nanoestruturados para otimizar a biodisponibilidade e a eficácia terapêutica. Dentre eles, destacam-se as nanopartículas magnéticas (MNPs) revestidas com citrato (Cit-MNPs), capazes de serem guiadas por campos magnéticos externos e utilizadas para entrega de fármacos. Assim, o objetivo deste trabalho foi de realizar o processo de internalização celular de MNPs em queratinócitos humanos *in vitro*, utilizando as técnicas de Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC), *Electron Paramagnetic Resonance* (EPR) e Microscopia Eletrônica de Transmissão (TEM) para monitoramento e caracterização desse processo. Adicionalmente, avaliou-se a viabilidade celular por meio do ensaio de MTT. As Cit-MNPs foram sintetizadas e caracterizadas, sendo aplicadas em culturas de células HaCat nas concentrações de 5%, 10% e 15%, com tempos de interação de 1h, 6h, 12h e 24h. Amostras contendo partículas que não aderiram à superfície da placa (sobrenadante) e as que aderiram (partículas com células) foram avaliadas no sensor de Cavidade BAC e no EPR, que revelaram aumento progressivo da sinalização magnética ao longo do tempo, especialmente nas concentrações de 10% e 15%. O teste de MTT demonstrou alta viabilidade celular (>90%) após 24h de exposição, embora após 72h tenha sido observada redução da viabilidade, possivelmente associada ao tempo prolongado de contato e à depleção de nutrientes. A análise por TEM confirmou a presença de MNPs no interior celular, incluindo citoplasma e regiões perinucleares, além de partículas aderidas à membrana plasmática. Os resultados obtidos nesse estudo evidenciam que as técnicas BAC e EPR são eficazes para quantificar MNPs em sistemas celulares, enquanto o TEM fornece comprovação morfológica da internalização. As Cit-MNPs mostraram potencial para aplicações tópicas em liberação controlada de fármacos e diagnósticos, embora estudos adicionais sejam necessários para elucidar mecanismos de captação e impacto funcional sobre as células.

Palavras-chave: BAC, EPR, queratinócitos, nanopartículas magnéticas, cultura celular

ABSTRACT

Among drug administration routes, the topical route offers advantages, such as avoiding first-pass metabolism and enabling targeted application to the skin. However, structural barriers, such as the stratum corneum, limit drug penetration, motivating the development of nanostructured systems to optimize bioavailability and therapeutic efficacy. Among these, magnetic nanoparticles (MNPs) coated with citrate (Cit-MNPs) stand out, as they can be guided by external magnetic fields and used for drug delivery. Thus, the aim of this work was to investigate the cellular internalization process of MNPs in human keratinocytes *in vitro*, using Alternating Current Biosusceptometry (ACB), Electron Paramagnetic Resonance (EPR), and Transmission Electron Microscopy (TEM) techniques to monitor and characterize this process. Additionally, cell viability was assessed using the MTT assay. Cit-MNPs were synthesized and characterized, and applied to HaCaT cell cultures at concentrations of 5%, 10%, and 15%, with interaction times of 1 h, 6 h, 12 h, and 24 h. Samples containing particles that did not adhere to the plate surface (supernatant) and those that adhered (particles with cells) were evaluated using the ACB cavity sensor and EPR, which revealed a progressive increase in magnetic signaling over time, especially at concentrations of 10% and 15%. The MTT test demonstrated high cell viability (>90%) after 24 h of exposure, although a reduction in viability was observed after 72 h, possibly associated with prolonged contact time and nutrient depletion. TEM analysis confirmed the presence of MNPs inside the cells, including in the cytoplasm and perinuclear regions, as well as particles adhered to the plasma membrane. The results obtained in this study demonstrate that ACB and EPR techniques are effective for quantifying MNPs in cellular systems, while TEM provides morphological evidence of internalization. Cit-MNPs showed potential for topical applications in controlled drug release and diagnostics, although further studies are needed to elucidate uptake mechanisms and functional impacts on cells.

Keywords: ACB, EPR, keratinocytes, magnetic nanoparticles, cell culture

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de funcionamento do sistema BAC.	17
Figura 2. Diagrama dos níveis de energia de um spin de uma nitroxila na presença de um campo magnético externo.	19
Figura 3. Imagem do EPR Jeol JES-FA200 utilizado nesse trabalho.....	19
Figura 4. Exemplo de contagem de células utilizando o reagente Trypan Blue.	23
Figura 5. Gráfico da curva de concentrações de MNPs diluídas em água destilada, representado pela intensidade de sinal aferido (mV) no sistema BAC Cavidade em função da concentração da amostra (mg/mL).....	27
Figura 6. Gráfico da curva de concentrações de MNPs diluídas em água destilada, representado pela (A) área sob a curva em função da concentração da amostra e (B) Altura do pico em função da concentração da amostra.	28
Figura 7. Teste de Viabilidade MTT. A) 24 horas e B) 72 horas.....	29
Figura 8. Gráfico de barras das amostras sobrenadantes e tripsinizadas, para as concentrações de 5%, 10% e 15% no tempo de 1 hora. (A) Aquisição via BAC Cavidade em mV. (B) Sinal BAC convertido para massa de MNPs (mg).	30
Figura 9. Gráfico de barras das amostras sobrenadantes e tripsinizadas, para as concentrações de 5%, 10% e 15% no tempo de 6 horas. (A) Aquisição via BAC Cavidade em mV. (B) Sinal BAC convertido para massa de MNPs (mg).....	31
Figura 10. Gráfico de barras das amostras sobrenadantes e tripsinizadas, para as concentrações de 5%, 10% e 15% no tempo de 12 horas. (A) Aquisição via BAC Cavidade em mV. (B) Sinal BAC convertido para massa de MNPs (mg).....	32
Figura 11. Gráfico de barras das amostras sobrenadantes e tripsinizadas, para as concentrações de 5%, 10% e 15% no tempo de 24 horas. (A) Aquisição via BAC Cavidade em mV. (B) Sinal BAC convertido para massa de MNPs (mg).....	33
Figura 12. Gráfico de barras das amostras tripsinizadas, para as concentrações de 5%, 10% e 15% no tempo de 24 horas. (A) Aquisição via BAC Cavidade em mV. (B) Sinal BAC convertido para massa de MNPs (mg).....	34
Figura 13. Espectro EPR do grupo T com concentração de (A) 5%, (B) 10% e (C) 15%	35
Figura 14. Gráfico de barras da Altura do Pico das amostras tripsinizadas, para as concentrações de 5%, 10% e 15% ao longo do tempo. (A) Concentração de 5%, (B) Concentração de 10% e (C) Concentração de 15%.....	36
Figura 15. Gráfico de barras do Pico Máximo das amostras tripsinizadas, para as concentrações de 5%, 10% e 15% ao longo do tempo. (A) Concentração de 5%, (B) Concentração de 10% e (C) Concentração de 15%.....	38
Figura 16. Imagem TEM de uma célula de queratinócitos HaCat contendo MNPs. (A) ampliação de 10µm. (B) ampliação de 5µm.....	39

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Tabela expressando a relação entre as concentrações e seus valores em mg/mL e massa de MNPs, calculado a partir da intensidade de sinal via BAC Cavidade.. **17**
- Tabela 2.** Tabela expressando a relação entre as concentrações e seus valores em mg/mL e massa de MNPs, calculado a partir da intensidade de sinal via BAC Cavidade.. **19**

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Variação de fluxo magnético na bobina detectora.....	17
Equação 2. Lei da Indução de Faraday.	18
Equação 3. Diferença de energia entre os estados de maior e menor energia do spin do elétron.....	18
Equação 4. Equação fundamental de energia para espectroscopia EPR.....	19
Equação 5. Equação para obtenção do fator g.....	20
Equação 6. Cálculo de viabilidade celular (%).....	22
Equação 7. Cálculo da quantidade de células viáveis por mL de solução.	22

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

UV: Ultravioleta

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio; ensaio de viabilidade celular

MNPs: *Magnetic Nanoparticles*

FDA: *Food and Drug Administration*

MRI: *Magnetic Resonance Imaging*

MPI: *Magnetic Particle Imaging*

SQUID: *Superconducting Quantum Interference Device*

MRX: *Magnetorelaxometry*

BAC: Biosusceptometria de Corrente Alternada

EPR: *Electron Paramagnetic Resonance*

TEM: *Transmission Electron Microscopy*

DLS: *Dynamic Light Scattering*

VSM: *Vibrating-Sample Magnetometer*

PH: *Peak Height*

PM: Pico Máximo

FWHM: *Full Width at Half Maximum*

T: Tripsinizado

S: Sobrenadante

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS.....	8
LISTA DE EQUAÇÕES	9
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	10
RESUMO	11
ABSTRACT	12
1. INTRODUÇÃO	13
2. OBJETIVO	16
3. METODOLOGIA.....	16
3.1. BIOSUSCEPTOMETRIA DE CORRENTE ALTERNADA (BAC)	16
3.2. RESSONÂNCIA PARAMAGNÉTICA ELETRÔNICA (EPR)	18
3.2.1 FATOR G	20
3.3. SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS MNPs.....	20
3.4. DESENVOLVIMENTO DA LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS	20
3.4.1. CULTIVO DA LINHAGEM DE QUERATINÓCITOS	20
3.4.2. MANUTENÇÃO DA CULTURA CELULAR	21
3.4.3. PROTOCOLO DE CONTAGEM DE CÉLULAS	22
3.5. TESTE DE VIABILIDADE MTT	23
3.5.1. PROTOCOLO PARA TESTE DE VIABILIDADE MTT.....	23
3.6. CARACTERIZAÇÃO DAS MNPs VIA BAC.....	24
3.6.1. CONCENTRAÇÕES DE MNPs PARA O PROTOCOLO <i>IN VITRO</i> ..	24
3.7. CARACTERIZAÇÃO DAS MNPs VIA EPR.....	24
3.8. PROTOCOLO <i>IN VITRO</i>	25
3.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)	26
3.10. ANÁLISE DOS DADOS.....	26
3.10.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MNPS E PROTOCOLO <i>IN VITRO</i> VIA BAC	26
3.10.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MNPS E PROTOCOLO <i>IN VITRO</i> VIA EPR	27
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
4.1. CARACTERIZAÇÃO DAS MNPs VIA BAC.....	27
4.2. CARACTERIZAÇÃO DAS MNPs VIA EPR.....	28
4.3. TESTE DE VIABILIDADE MTT	29
4.4. EXPERIMENTO CELULAR <i>IN VITRO</i>	30
4.4.1. ANÁLISE VIA BAC	30
4.4.1.1. TEMPO DE INTERAÇÃO DE 1 HORA.....	30

4.4.1.2. TEMPO DE INTERAÇÃO DE 6 HORAS.....	30
4.4.1.3. TEMPO DE INTERAÇÃO DE 12 HORAS.....	31
4.4.1.4. TEMPO DE INTERAÇÃO DE 24 HORAS.....	32
4.4.1.5. ANÁLISE VIA BAC AO LONGO DO TEMPO	33
4.4.2. ANÁLISE VIA EPR.....	35
4.4.2.1. ANÁLISE DA ALTURA DO PICO.....	35
4.4.2.2. ANÁLISE DE PICO MÁXIMO.....	37
4.4.3. ANÁLISE VIA MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (TEM)	38
5. CONCLUSÃO	40
6. REFERÊNCIAS	41

1. Introdução

A pele, como maior órgão do corpo humano, tem evoluído ao longo do tempo para se tornar uma rota indispensável para entrega de fármacos, oferecendo efeitos tópicos e até mesmo sistêmicos, sendo uma via de administração de maior aceitação do que pelas vias parenteral e oral, por exemplo (1).

A pele humana é composta por camadas, como a epiderme, camada mais externa e composta por diversos estratos e tipos celulares cruciais para seu funcionamento. A derme, conectada à epiderme pela membrana basal, possui a função de acomodar as glândulas sudoríparas, cabelos, folículos capilares, músculos, neurônios sensoriais e vasos sanguíneos. Lóbulos adiposos, neurônios sensoriais e vasos sanguíneos são encontrados na hipoderme, a mais interna e última camada da pele (2).

Entre as camadas, a epiderme tem sido amplamente estudada, tanto como um modelo convincente de diferenciação tecidual (3), quanto por sua importância médica em feridas (4), carcinogênese (5), disfunções epiteliais congênitas ou adquiridas (6), infecções (7), regeneração (8) e rejuvenescimento (9). No entanto, as funções de sua barreira natural impedem que a maioria dos microrganismos, radiação ultravioleta (UV), produtos químicos e até mesmo fármacos penetrem na pele, mesmo que em doses terapêuticas (10). Isso se deve à espessura física do estrato córneo, uma camada multicelular de quinze micrometros, a qual desempenha um papel fundamental na proteção e filtragem do que atravessa a pele e penetra o corpo humano (11).

A absorção de fármacos, compostos químicos e até mesmo cosméticos através da pele ocorre por meio de alguns processos. A primeira barreira para a penetração é o estrato córneo, cuja permeabilidade é determinada por características da substância, como solubilidade, concentração e tamanho molecular (12), uma vez que qualquer substância que tenha a pele como local de ação requer evidência estrutural em nível molecular do local, para clarificar as interações com lipídios intercelulares e queratina mole (13). Após penetrar o estrato córneo, a substância deve ultrapassar a epiderme e derme, onde as moléculas podem se difundir ao longo das camadas de células e dos tecidos (14), sendo que a derme é o local onde certos processos de cicatrização podem gerar uma produção excessiva de matriz extracelular fibrosa, levando à formação de queloides (15).

Desta forma, as propriedades das substâncias vão determinar se a absorção será local, agindo diretamente nas células ou tecidos do local de aplicação e produzindo efeitos tópicos,

ou sistêmica, caso a substância atinja a derme e entre na corrente sanguínea, podendo ser distribuída ao longo de todo o corpo humano (16). Para contornar esse desafio, uma alternativa é a utilização de sistemas de entrega de fármacos capazes de ultrapassar as barreiras naturais e não serem afetados pelas propriedades morfológicas e físico-químicas do local de ação (17), como os sistemas de entrega transdermais, através da utilização de adesivos acoplados à pele e com liberação controlada de fármacos ao longo do tempo (18); sistemas iontoforéticos, que utilizam correntes elétricas de baixa intensidade para facilitar a penetração de íons através da pele (19) e o uso de ácido hialurônico, o qual pode se ligar quimicamente com fármacos através de ligações covalentes, permitindo a liberação controlada e direcionada dos mesmos (20).

Avanços recentes em nanotecnologia permitiram o desenvolvimento de partículas nanométricas para diversas aplicações biomédicas. Diferentes tipos de partículas, desde nanoestruturas lipídicas, até partículas polimerizadas foram utilizadas em diferentes sistemas de entrega de fármacos em modelos pré-clínicos, demonstrando alta eficácia terapêutica (21). Entre eles destaca-se o uso de Nanopartículas Magnéticas (MNPs – do inglês *Magnetic Nanoparticles*), uma das classes de estruturas nanométricas mais promissoras atualmente, devido à sua versatilidade e sendo aplicáveis em diversas vertentes da área da saúde (22), já estando até mesmo presentes em nanomedicamentos aprovados pelo *Food and Drug Administration* (FDA) dos Estados Unidos (23).

A principal vantagem do uso de drogas baseadas em nanopartículas magnéticas em comparação com outros sistemas nanoparticulados é sua capacidade de serem guiadas até locais específicos de ação dentro do corpo utilizando campos magnéticos externos. Essa propriedade permite uma entrega mais precisa e direcionada dos fármacos, aumentando a eficácia do tratamento e reduzindo os efeitos colaterais sistêmicos (24).

A associação de MNPs e cultura celular é utilizada para compreender os processos de internalização celular e biocompatibilidade. Recentemente, MNPs têm sido utilizadas em construção e montagem em bioengenharia, desempenhando papéis importantes como marcação de células ou suporte ao crescimento, viabilidade e adesão celular em *scaffolds*, enxertos de queratinócitos capazes de aprimorar práticas clínicas em casos de queimaduras graves e úlceras crônicas.

O controle das funções celulares mediado por magnetismo representa uma abordagem promissora para compreender as vias de transdução e os efetores envolvidos nas cascatas

de sinalização. A manipulação das funções e estruturas celulares através da atuação com MNPs é uma estratégia relativamente nova, que tem mostrado um potencial significativo para aplicação na engenharia tecidual (25,26). Além disso, essa abordagem oferece uma perspectiva interessante para a administração tópica de MNPs, podendo ser adaptada para a entrega de drogas. Devido à importância de obter um modelo *in vitro* capaz de se comportar de forma similar à epiderme, a cultura celular de queratinócitos mostra-se como uma viável alternativa na reparação de danos na pele com enxertos de queratinócitos cultivados.

A linhagem celular HaCaT é derivada de queratinócitos humanos espontaneamente imortalizados (27). Essas células exibem propriedades celulares basais e conseguem responder a diferentes indutores de diferenciação, como Ca^{2+} e alta densidade celular (28). Devido à grande quantidade de publicações na literatura a respeito das suas propriedades de desenvolvimento e seu consistente crescimento em culturas celulares, as células HaCaT são um excelente modelo de sistema para conduzir análises em queratinócitos (29).

Atualmente existem diversos estudos *in vitro* a partir de culturas celulares e agentes nanoestruturados. Dentre esses, os resultados mais promissores são através de Imageamento por Ressonância Magnética (MRI – do inglês *Magnetic Resonance Imaging*), através do monitoramento da alteração dos tempos de relaxação dos prótons, Imageamento de Partícula Magnética (MPI – do inglês *Magnetic Particle Imaging*), de acordo com a detecção da geração de harmônicos no sistema e os SQUID (do inglês *Superconducting Quantum Interference Device*), os quais monitoram o processo de MRX (do inglês *Magnetorelaxometry*) (30,31). Essas técnicas, apesar dos bons resultados, apresentam desvantagens como sua alta complexibilidade e custo de aquisição e instalação, impossibilidade de aplicação em experimentação animal e a necessidade de ambiente magneticamente blindado.

Buscando diminuir custos, introduz-se a metodologia Biosusceptometria de Corrente Alternada (BAC), um dispositivo portátil capaz de monitorar e detectar quantitativamente as MNPs em sistemas *in vitro* e *in vivo*, sendo utilizado para estudos de circulação sanguínea (32), biodistribuição ao longo dos tecidos e órgãos (33), retenção hepática (34), perfusão renal (35) e cerebral (22), estudos de lesões renais (36), além de estudos iniciais avaliando o processo de internalização celular (37). Outra técnica capaz de avaliar o processo de internalização celular de MNPs é a espectroscopia por ressonância paramagnética eletrônica

(EPR – do inglês *Electron Paramagnetic Resonance*), uma técnica biomagnética para investigar espécies no domínio paramagnético, ou seja, matérias que possuem elétrons desemparelhados, radicais orgânicos e inorgânicos e até sistemas com estados tripleto, permitindo uma avaliação qualitativa da presença de MNPs em ambiente celular (38).

Associando as duas técnicas, torna-se possível avaliar o processo de internalização celular de MNPs em diferentes parâmetros físicos, uma vez ambas as técnicas são capazes de quantificar o acúmulo de MNPs na amostra, e o EPR é capaz de monitor processos moleculares, como a presença de íons e radicais livres, independentemente do arranjo da partícula.

6. Referências

1. Chen Y, Feng X. Gold nanoparticles for skin drug delivery. *Int J Pharm* [Internet]. 25 de setembro de 2022 [citado 22 de julho de 2024];625. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35987319/>
2. Yousef H, Alhajj M, Fakoya AO, Sharma S. Anatomy, Skin (Integument), Epidermis. *StatPearls* [Internet]. 8 de junho de 2024 [citado 8 de setembro de 2024]; Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470464/>
3. Ghadially R. 25 years of epidermal stem cell research. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2012 [citado 22 de julho de 2024];132(3 Pt 2):797–810. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22205306/>
4. Lootens L, Brusselaers N, Beele H, Monstrey S. Keratinocytes in the treatment of severe burn injury: an update. *Int Wound J* [Internet]. fevereiro de 2013 [citado 22 de julho de 2024];10(1):6–12. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22958654/>
5. Morris RJ. A perspective on keratinocyte stem cells as targets for skin carcinogenesis. *Differentiation*. 1o de outubro de 2004;72(8):381–6.
6. Raj D, Brash DE, Grossman D. Keratinocyte Apoptosis in Epidermal Development and Disease. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2006 [citado 22 de julho de 2024];126(2):243. Disponível em: [/pmc/articles/PMC2291295/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/162291295/)
7. Schröder JM. The role of keratinocytes in defense against infection. *Curr Opin Infect Dis* [Internet]. abril de 2010 [citado 22 de julho de 2024];23(2):106–10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20010101/>
8. Bellu E, Medici S, Coradduzza D, Cruciani S, Amler E, Maioli M. Nanomaterials in Skin Regeneration and Rejuvenation. *Int J Mol Sci* [Internet]. 1o de julho de 2021 [citado 27 de janeiro de 2025];22(13). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34209468/>

9. Griffiths TW, Watson REB, Langton AK. Skin ageing and topical rejuvenation strategies. *Br J Dermatol* [Internet]. 1o de outubro de 2023 [citado 27 de janeiro de 2025];189(Suppl 1):I17–23. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37903073/>
10. Güngör S, Kahraman E. Nanocarriers Mediated Cutaneous Drug Delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. 1o de março de 2021;158:105638.
11. Menon GK, Cleary GW, Lane ME. The structure and function of the stratum corneum. *Int J Pharm*. 1o de outubro de 2012;435(1):3–9.
12. Elias PM. Structure and Function of the Stratum Corneum Extracellular Matrix. *J Invest Dermatol* [Internet]. 2012 [citado 8 de setembro de 2024];132(9):2131. Disponível em: </pmc/articles/PMC3587970/>
13. Hatta I, Nakazawa H, Ohta N, Uchino T, Yanase K. Stratum Corneum Function: A Structural Study with Dynamic Synchrotron X-ray Diffraction Experiments. *J Oleo Sci* [Internet]. 2021 [citado 28 de janeiro de 2025];70(9):1181–99. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34373412/>
14. Barry BW. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 2001 [citado 8 de setembro de 2024];14(2):101–14. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11500256/>
15. Ekstein SF, Wyles SP, Moran SL, Meves A. Keloids: a review of therapeutic management. *Int J Dermatol* [Internet]. 1o de junho de 2021 [citado 27 de janeiro de 2025];60(6):661–71. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ijd.15159>
16. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol* [Internet]. novembro de 2008 [citado 8 de setembro de 2024];26(11):1261–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18997767/>
17. Gandarillas A. Epidermal differentiation, apoptosis, and senescence: common pathways? *Exp Gerontol* [Internet]. fevereiro de 2000 [citado 22 de julho de 2024];35(1):53–62. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10705039/>
18. Prausnitz MR, Langer R. Transdermal drug delivery. *Nature Biotechnology* 2008 26:11 [Internet]. 7 de novembro de 2008 [citado 28 de janeiro de 2025];26(11):1261–8. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nbt.1504>
19. Bakshi P, Vora D, Hemmady K, Banga AK. Iontophoretic skin delivery systems: Success and failures. *Int J Pharm* [Internet]. 30 de agosto de 2020 [citado 28 de janeiro de 2025];586. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32603836/>
20. Zhu S, Li X, Dang B, Wu F, Wang C, Lin C. Lycium Barbarum polysaccharide protects HaCaT cells from PM2.5-induced apoptosis via inhibiting oxidative stress, ER stress and autophagy. *Redox Report* [Internet]. 31 de dezembro de 2022 [citado 29 de janeiro de 2025];27(1):1–10. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36888888/>

- 2025];27(1):32–44. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/13510002.2022.2036507>
21. Papakostas D, Rancan F, Sterry W, Blume-Peytavi U, Vogt A. Nanoparticles in dermatology. *Arch Dermatol Res* [Internet]. 12 de outubro de 2011 [citado 22 de julho de 2024];303(8):533–50. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00403-011-1163-7>
 22. Próspero AG, Soares GA, Moretto GM, Quini CC, Bakuzis AF, De Arruda Miranda JR. Dynamic cerebral perfusion parameters and magnetic nanoparticle accumulation assessed by AC biosusceptometry. *Biomed Tech (Berl)* [Internet]. 1o de junho de 2020 [citado 28 de julho de 2024];65(3):343–51. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31714878/>
 23. Saha AK, Zhen MYS, Erogbogbo F, Ramasubramanian AK. Design Considerations and Assays for Hemocompatibility of FDA-Approved Nanoparticles. *Semin Thromb Hemost* [Internet]. 1o de julho de 2020 [citado 22 de outubro de 2024];46(5):637–52. Disponível em: <http://www.thieme-connect.de/products/ejournals/html/10.1055/s-0039-1688491>
 24. Lu YJ, Hsu HL, Lan YH, Chen JP. Thermosensitive Cationic Magnetic Liposomes for Thermoresponsive Delivery of CPT-11 and SLP2 shRNA in Glioblastoma Treatment. *Pharmaceutics* [Internet]. 1o de abril de 2023 [citado 28 de julho de 2024];15(4):1169. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1999-4923/15/4/1169/htm>
 25. Guan W, Gao H, Liu Y, Sun S, Li G. Application of magnetism in tissue regeneration: recent progress and future prospects. *Regen Biomater* [Internet]. 2 de janeiro de 2024 [citado 22 de outubro de 2024];11. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/rb/rbae048>
 26. Oliveira CS, Nascimento M, De Almeida Junior E, Crusoé M, Bahia P, Rosa FP. Avanços e aplicações da bioengenharia tecidual. *Revista de Ciências Médicas e Biológicas* [Internet]. 18 de novembro de 2010 [citado 22 de outubro de 2024];9(1):28. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/324554766_Avancos_e_aplicacoes_da_bioengenharia_tecidual
 27. Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol* [Internet]. 1988 [citado 8 de setembro de 2024];106(3):761–71. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2450098/>
 28. Capone RB, Pai SI, Koch WM, Gillison ML, Danish HN, Westra WH, et al. Detection and quantitation of human papillomavirus (HPV) DNA in the sera of patients with HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* [Internet]. 2000 [citado 8 de setembro de 2024];6(11):4171–5. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11106228/>

29. Wilson VG. Growth and differentiation of HaCaT keratinocytes. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2014 [citado 8 de setembro de 2024];1195:33–41. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24155234/>
30. Lu C, Han L, Wang J, Wan J, Song G, Rao J. Engineering of magnetic nanoparticles as magnetic particle imaging tracers. *Chem Soc Rev* [Internet]. 19 de julho de 2021 [citado 22 de outubro de 2024];50(14):8102–46. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2021/cs/d0cs00260g>
31. Rezaei B, Tay ZW, Mostufa S, Manzari ON, Azizi E, Ciannella S, et al. Magnetic nanoparticles for magnetic particle imaging (MPI): design and applications. *Nanoscale* [Internet]. 27 de junho de 2024 [citado 22 de outubro de 2024];16(25):11802–24. Disponível em: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2024/nr/d4nr01195c>
32. Próspero AG, Quini CC, Bakuzis AF, Fidelis-de-Oliveira P, Moretto GM, Mello FPF, et al. Real-time in vivo monitoring of magnetic nanoparticles in the bloodstream by AC biosusceptometry. *J Nanobiotechnology* [Internet]. 21 de março de 2017 [citado 28 de julho de 2024];15(1):1–12. Disponível em: <https://jnanobiotechnology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12951-017-0257-6>
33. Soares GA, Prospero AG, Calabresi MF, Rodrigues DS, Simoes LG, Quini CC, et al. Multichannel AC Biosusceptometry System to Map Biodistribution and Assess the Pharmacokinetic Profile of Magnetic Nanoparticles by Imaging. *IEEE Trans Nanobioscience* [Internet]. 1o de julho de 2019 [citado 28 de julho de 2024];18(3):456–62. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30998477/>
34. Quini CC, Próspero AG, Calabresi MFF, Moretto GM, Zufelato N, Krishnan S, et al. Real-time liver uptake and biodistribution of magnetic nanoparticles determined by AC biosusceptometry. *Nanomedicine*. 1o de maio de 2017;13(4):1519–29.
35. Quini CC, Matos JF, Próspero AG, Calabresi MFF, Zufelato N, Bakuzis AF, et al. Renal perfusion evaluation by alternating current biosusceptometry of magnetic nanoparticles. *J Magn Magn Mater*. 15 de abril de 2015;380:2–6.
36. Prospero AG, Fidelis-De-Oliveira P, Soares GA, Miranda MF, Pinto LA, Dos Santos DC, et al. AC biosusceptometry and magnetic nanoparticles to assess doxorubicin-induced kidney injury in rats. *Nanomedicine (Lond)* [Internet]. 1o de fevereiro de 2020 [citado 28 de julho de 2024];15(5):511–25. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32077357/>
37. Quini CC, Próspero AG, Kondiles BR, Chaboub L, Hogan MK, Baffa O, et al. Development of a protocol to assess cell internalization and tissue uptake of magnetic nanoparticles by AC Biosusceptometry. *J Magn Magn Mater*. 1o de março de 2019;473:527–33.
38. Weil JA, Bolton JR. *Electron Paramagnetic Resonance*. 22 de dezembro de 2006 [citado 28 de julho de 2024]; Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/book/10.1002/0470084987>

39. de Oliveira RB, Matsuda NM. An AC biosusceptometer to study gastric emptying. *Med Phys* [Internet]. 1992 [citado 18 de agosto de 2024];19(2):445–8. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1584144/>
40. Kumar P, Nagarajan A, Uchil PD. Analysis of Cell Viability by the MTT Assay. *Cold Spring Harb Protoc* [Internet]. 1o de junho de 2018 [citado 29 de janeiro de 2025];2018(6):pdb.prot095505. Disponível em: <http://cshprotocols.cshlp.org/content/2018/6/pdb.prot095505.full>
41. Pascua-Maestro R, Corraliza-Gomez M, Diez-Hermano S, Perez-Segurado C, Ganfornina MD, Sanchez D. The MTT-formazan assay: Complementary technical approaches and in vivo validation in *Drosophila* larvae. *Acta Histochem* [Internet]. 1o de abril de 2018 [citado 29 de janeiro de 2025];120(3):179–86. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29395318/>
42. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 16 de dezembro de 1983;65(1–2):55–63.
43. Stoppa EG, Soares GA, Buranello LP, Portela LMF, Justulin LA, Américo MF, et al. Non-invasive biomagnetic assessment of gastrointestinal motility in a loperamide-induced constipation model. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* [Internet]. 5 de abril de 2024 [citado 9 de setembro de 2024];60:e23717. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/bjps/a/kPVx9jHbYdJgVdyb8BNcGpb/>
44. Transmission Electron Microscopy. 2008 [citado 3 de fevereiro de 2025];36. Disponível em: <https://link.springer.com/10.1007/978-0-387-40093-8>
45. Hachtel JA, Jakowski J, Huang J, Jansone-Popova S, Popovs I, Richardson EA, et al. A New Path to Nanoscale Cellular Analysis with Monochromated Electron Energy-Loss Spectroscopy. 8 de junho de 2022 [citado 12 de fevereiro de 2025]; Disponível em: <https://arxiv.org/abs/2206.04191v1>
46. Liu C, Eschen W, Loetgering L, Molina DS, Klas R, Iliou A, et al. Visualizing the ultra-structure of microorganisms using table-top extreme ultraviolet imaging. *PhotonIX* [Internet]. 8 de novembro de 2022 [citado 12 de fevereiro de 2025];4(1). Disponível em: <http://arxiv.org/abs/2211.04135>
47. Jaiana M, Ferreira G, Gouveia F, Dias B, Rodrigues Muniz C, Morais L, et al. Metodologia de microscopia eletrônica de transmissão para avaliação da ação antibacteriana de substâncias extraídas de plantas. 2022 [citado 12 de fevereiro de 2025]; Disponível em: <http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/handle/doc/1141624>
48. Monfort T, Azzollini S, Brogard J, Cléménçon M, Slembrouck-Brec A, Forster V, et al. Dynamic full-field optical coherence tomography module adapted to commercial microscopes allows longitudinal in vitro cell culture study. *Communications Biology* 2023 6:1 [Internet]. 28 de setembro de 2023 [citado 12 de fevereiro de 2025];6(1):1–17. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s42003-023-05378-w>

49. Garanina A, Vishnevskiy D, Chernysheva A, Malinovskaya J, Lazareva P, Semkina A, et al. The Internalization Pathways of Liposomes, PLGA, and Magnetic Nanoparticles in Neutrophils. *Biomedicines* 2024, Vol 12, Page 2180 [Internet]. 25 de setembro de 2024 [citado 22 de outubro de 2024];12(10):2180. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2227-9059/12/10/2180/htm>
50. Santini B, Zanoni I, Marzi R, Cigni C, Bedoni M, Gramatica F, et al. Cream formulation impact on topical administration of engineered colloidal nanoparticles. *PLoS One* [Internet]. 11 de maio de 2015 [citado 22 de outubro de 2024];10(5). Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25962161/>
51. Kiss AL, Botos E. Endocytosis via caveolae: Alternative pathway with distinct cellular compartments to avoid lysosomal degradation? *J Cell Mol Med* [Internet]. julho de 2009 [citado 22 de julho de 2025];13(7):1228–37. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19382909/>
52. Kaksonen M, Roux A. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2018 19:5 [Internet]. 7 de fevereiro de 2018 [citado 22 de julho de 2025];19(5):313–26. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrm.2017.132>
53. Sahay G, Alakhova DY, Kabanov A V. Endocytosis of nanomedicines. *Journal of Controlled Release* [Internet]. agosto de 2010 [citado 22 de julho de 2025];145(3):182–95. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20226220/>
54. Khalil IA, Kogure K, Akita H, Harashima H. Uptake pathways and subsequent intracellular trafficking in nonviral gene delivery. *Pharmacol Rev* [Internet]. março de 2006 [citado 22 de julho de 2025];58(1):32–45. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16507881/>
55. Wilhelm C, Billotey C, Roger J, Pons JN, Bacri JC, Gazeau F. Intracellular uptake of anionic superparamagnetic nanoparticles as a function of their surface coating. *Biomaterials* [Internet]. março de 2003 [citado 22 de julho de 2025];24(6):1001–11. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12504522/>
56. Nowak-Jary J, Machnicka B. In vivo Biodistribution and Clearance of Magnetic Iron Oxide Nanoparticles for Medical Applications. *Int J Nanomedicine* [Internet]. 2023 [citado 22 de julho de 2025];18:4067–100. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37525695/>