



GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI
PAULO CÉSAR DE MORAIS E
RICARDO BENTES DE AZEVEDO (ORG.)

NANOTECNOLOGIA: CONSIDERAÇÕES EM MATERIAIS, SAÚDE E MEIO AMBIENTE

EDITORA
UnB 60





Universidade de Brasília

**Reitora
Vice-Reitor**

Márcia Abrahão Moura
Enrique Huelva

EDITORA



UnB

Diretora

Germana Henriques Pereira

Conselho editorial

Germana Henriques Pereira (Presidente)
Fernando César Lima Leite
Ana Flávia Magalhães Pinto
Andrey Rosenthal Schlee
César Lignelli
Gabriela Neves Delgado
Guilherme Sales Soares de Azevedo Melo
Liliane de Almeida Maia
Mônica Celeida Rabelo Nogueira
Roberto Brandão Cavalcanti
Sely Maria de Souza Costa

GRAZIELLA ANSELMO JOANITTI
PAULO CÉSAR DE MORAIS E
RICARDO BENTES DE AZEVEDO (ORG.)

NANOTECNOLOGIA: CONSIDERAÇÕES EM MATERIAIS, SAÚDE E MEIO AMBIENTE

EDITORA
UnB 60 

Coordenação de produção editorial

Preparação e revisão

Diagramação

Equipe editorial

Marília Carolina de Moraes Florindo

Gabriela Artemis

Bruno Ribeiro Soares

© 2022 Editora Universidade de Brasília

Direitos exclusivos para esta edição:

Editora Universidade de Brasília

Centro de Vivência, Bloco A - 2ª etapa, 1ª andar

Campus Darcy Ribeiro, Asa Norte, Brasília/DF

CEP: 70910-900

Site: www.editora.unb.br

E-mail: contato.editora@unb.br

Todos os direitos reservados.

Nenhuma parte desta publicação poderá ser armazenada ou reproduzida por qualquer meio sem a autorização por escrito da Editora.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade de Brasília - BCE/UNB)

N186 Nanotecnologia : considerações em materiais, saúde e meio ambiente / Graziella Anselmo Joanitti, Paulo César de Moraes e Ricardo Bentes de Azevedo (organizadores). – Brasília : Editora Universidade de Brasília, 2022.
517 p.

ISBN 978-65-5846-109-8 .

1. Nanomedicina. 2. Nanotecnologia. 3. Nanociência. 4. Materiais nanoestruturados. I. Joanitti, Graziella Anselmo (org.). II. Moraes, Paulo César de (org.). III. Azevedo, Ricardo Bentes de (org.).

CDU 57:61

Rhuama Barbosa do Carmo - CRB 1/3060



Associação Brasileira
das Editoras Universitárias

Sumário

Introdução	7
-------------------------	----------

PARTE I

MATERIAIS - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS

Capítulo 1	11
-------------------------	-----------

Nanopartículas de ouro: métodos clássicos de obtenção e caracterização

Claire N. Lunardi, Fellipy S. Rocha e Anderson J. Gomes
Universidade de Brasília

Capítulo 2	45
-------------------------	-----------

Nanoemulsões: preparação, características e estabilidade

Lucas C. Silva, Leonardo O. B. Silva e Graziella A. Joanitti
Universidade de Brasília

Capítulo 3	77
-------------------------	-----------

Lipossomas e suas aplicações

Jaqueline R. Da Silva, Jaqueline V. Oliveira e Victor Hugo S Araujo
Universidade de Brasília

Capítulo 4	101
-------------------------	------------

Síntese verde de nanomateriais

Luciano P. Silva, Beatriz S. Carvalho, Cíntia C. Bonatto, Júlia M. Pupe,
Tatiane M. Pereira e Thalita F. Araujo
EMBRAPA, Universidade de Brasília e Tecsinapse

Capítulo 5	174
-------------------------	------------

Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura como ferramentas de caracterização de nanossistemas

Tatiane Oliveira dos Santos e Renata Montenegro Igo
Universidade Federal de Goiás e Universidade Positivo

PARTE II

APLICAÇÕES EM SAÚDE

Capítulo 6	220
-------------------------	------------

Aplicações da nanotecnologia em câncer

Marcela G. Landim, Alicia S. Ombredane e Graziella A. Joanitti
Universidade de Brasília

Capítulo 7	266
Magneto-hipertermia aplicada ao tratamento do câncer Ailton Sousa-Junior, Harley Rodrigues, Marcus Carrião, Elisângela Silveira-Lacerda e Andris Bakuzis <i>Universidade Federal de Goiás e Instituto Federal de Goiás</i>	
Capítulo 8	308
Aplicações da nanotecnologia em tratamentos antivirais Andréia C. Pinheiro, Beatriz C. A. O. Faria, Patrícia L. Costa, Marília F. Calmon e Graziella A. Joanitti <i>Universidade de Brasília e Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”</i>	
Capítulo 9	356
Nanotecnologia aplicada para tratamentos de cicatrização e regeneração tecidual Marcella L. B. Carneiro, Glécia V. S. Luz, Christian R. Q. Quijia, Thamís F. Santana, Luna A. N. de Carvalho e Lourdes M. Brasil <i>Universidade de Brasília</i>	
Capítulo 10	402
Aplicação oftalmológica da nanotecnologia Maíra N. Pereira, Marcílio Cunha-Filho, Tais Gratieri e Guilherme M. Gelfuso <i>Universidade de Brasília</i>	
Capítulo 11	436
Aplicações da nanotecnologia em desordens e patologias cutâneas Patrícia Mazureki Campos, Fabíola Silva Garcia Praça e Marcelo Henrique Kravicz <i>Universidade Estadual de Ponta Grossa, Universidade de São Paulo e Universidade de Milano-Bicocca</i>	
<hr/>	
PARTE III	
MEIO AMBIENTE	
Capítulo 12	479
Nanotecnologias para descontaminação de águas Alex Fabiano Cortez Campos <i>Universidade de Brasília</i>	
Conclusão	513
Sobre os Organizadores	516

INTRODUÇÃO

A nanotecnologia hoje é uma realidade no nosso cotidiano. Abrange a síntese de novos materiais, como também aplicações na saúde humana e animal, e despoluição ambiental, entre muitas outras aplicações. Quando falamos de síntese de nanomateriais estamos nos referindo a um alto número de diferentes matérias (todas na escala nanométrica) e que podem ser utilizadas nas mais diferentes aplicações. Neste livro, será abordada a síntese de três tipos de nanomateriais, que poderá servir de ponto de partida para um futuro aprofundamento por parte do leitor se assim o desejar. Ademais, no tópico de síntese e caracterização, será abordada a chamada síntese verde, que busca utilizar recursos biológicos autossustentáveis associados a ganhos econômicos e sociais.

Em uma segunda seção, busca-se demonstrar o potencial do uso da nanotecnologia no tratamento de diferentes enfermidades, entre as quais câncer, doenças virais, doenças cutâneas, doenças oftalmológicas, cicatrização e regeneração tecidual. Aqui vale ressaltar que muitas outras doenças podem ser tratadas com auxílio de diferentes tipos de nanomateriais, pois, em geral, esses materiais não são fármacos em si, mas carreadores de fármacos, e visam aumentar a eficácia e eficiência, além de diminuir os efeitos colaterais. Importante ressaltar que os nanomateriais citados na seção 1 são, em muitos casos, utilizados para o carreamento dos fármacos, ou outra aplicação na área da saúde.

Finalmente, mas não menos importante, o livro apresenta uma discussão sobre as possibilidades do uso da nanotecnologia na descontaminação de corpos d'água. A discussão abrange os nanomateriais empregados, suas propriedades físico-químicas, os processos envolvidos, suas vantagens e limitações em comparação com os processos existentes, e as barreiras e necessidades de pesquisa para sua utilização em grande escala, de forma efetiva e segura.

O livro não pretende esgotar os assuntos abordados, mas espera que o leitor se familiarize com os conceitos apresentados e possa entender o processo para o uso dos nanomateriais, desde sua síntese e caracterização até algumas de suas aplicações. Boa leitura.

Dra. Graziella Joanitti

Dr. Paulo Morais

Dr. Ricardo Azevedo

Organizadores

PARTE I

MATERIAIS - SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DE NANOESTRUTURAS

CAPÍTULO 1

Nanopartículas de ouro: métodos clássicos de obtenção e caracterização

Claire N. Lunardi^{1*}; Fellipy S. Rocha²; Anderson J. Gomes^{1*}

1. Introdução

As nanopartículas de ouro (AuNP) possuem um vasto campo de investigação em pesquisa devido às suas diversas características físicas e químicas, contribuindo para o desenvolvimento da nanotecnologia¹⁻⁴. Essas partículas possuem uma estabilidade química e, em relação à realização de modificação da sua superfície, essa característica permite o seu uso em diversas aplicações, nos diferentes campos interdisciplinares da física, química, biologia, medicina e ciência dos materiais⁵⁻¹⁰.

Pesquisadores investigam o uso das AuNP frente às suas propriedades eletrônicas, ópticas, térmicas e catalíticas, permitindo a utilização na construção de biossensores, sistema de liberação gradativa de drogas, lubrificantes, células solares, catálise e outros¹¹⁻¹⁷. Devido à ampla área superficial por unidade de volume ou massa do metal, as AuNP tornam-se promissoras para catálise, o que é de grande interesse industrial.

Nós compilamos os 800 artigos mais citados nos últimos 10 anos no indexador Scopus, referentes ao procedimento de síntese de nano-

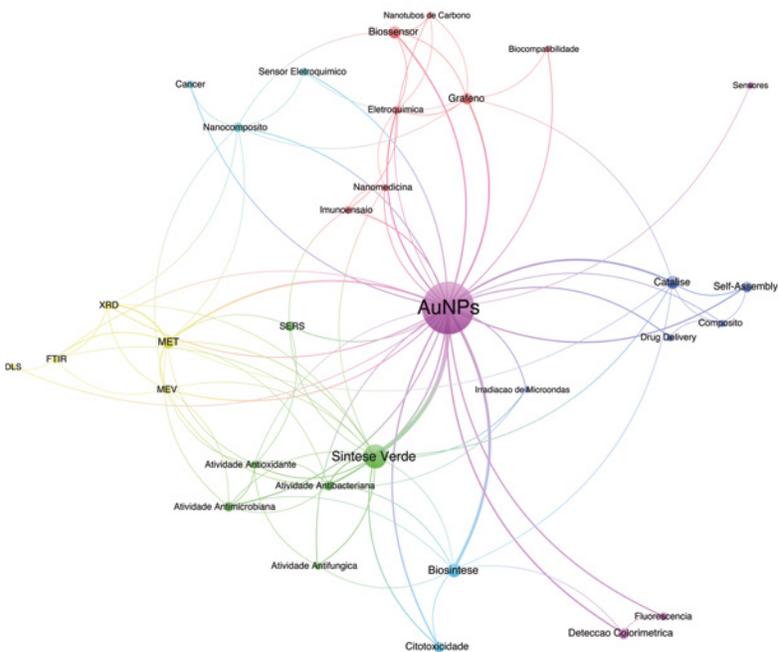
1.Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasil

2.PPG-Nano – IB, Universidade de Brasília, Brasil

E-mail: clunardi@unb.br; ajgomes@unb.br

partículas de ouro, e criamos um mapa bibliométrico com as 30 palavras-chave mais relevantes encontradas nesses artigos (**Figura 1**). O tamanho dos círculos está relacionado com a frequência das palavras-chave nos artigos enquanto as cores representam grupos com maior correspondência.

Figura 1: Mapa bibliométrico sobre a síntese de nanopartículas de ouro e suas correlações



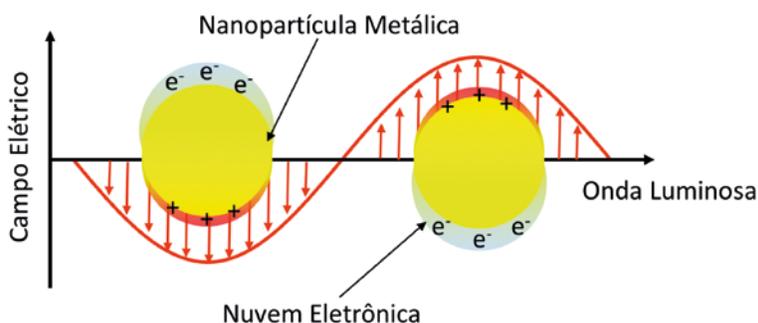
Fonte: Elaborado pelos autores com base no software VOSviewer ¹⁸.

Nanopartículas coloidais exibem propriedades elétricas, ópticas, magnéticas e químicas diferentes dos seus homólogos em massa. Essas propriedades são determinadas por parâmetros como tamanho, forma, composição e estrutura cristalina.

As dispersões coloidais compostas por nanopartículas metálicas diferenciam-se completamente das demais em virtude de uma propriedade óptica que elas apresentam, denominada de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR). Essa propriedade dá cor aos coloides formados e possui intensa absorção e espalhamento da luz na região visível do espectro eletromagnético ^{6, 8, 11, 19-21}.

As propriedades ópticas de nanopartículas metálicas surgem da interação da luz com nanoestruturas de dimensões menores que o seu comprimento de onda. Nessa condição, considera-se que a partícula está sob influência de um campo eletromagnético quase estático e homogêneo. Tal interação gera uma separação de cargas na superfície metálica, que apresenta uma forte força restauradora, originando um dipolo oscilante. Dessa forma, são induzidas oscilações coerentes dos elétrons da banda de condução da nanoestrutura em ressonância com a radiação incidente, dando origem a um campo eletromagnético intensificado na superfície da nanoestrutura (**Figura 2**).

Figura 2: Formação da Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR) das nanopartículas metálicas



Fonte: elaborada pelos autores.

Uma das vantagens dessa propriedade de SPR das AuNP consiste no fato de poderem absorver e dispersar a luz de forma tão intensa, o que permite que as nanopartículas individuais sejam observadas usando microscopia de campo escuro (dispersão óptica). Dessa forma, as AuNPs podem ser incorporadas a materiais como rótulos e serem utilizadas em imunoenaios, e como sensores bioquímicos e outros. Em relação ao tamanho, as nanopartículas de tamanhos menores podem ser utilizadas para a marcação de proteínas e imageamento celular porque a sua menor área de superfície reduz interações não específicas e permite um melhor direcionamento. Um aspecto importante a respeito da ressonância plasmônica refere-se ao fato de que esta é influenciada por condições que rodeiam a partícula, como o tipo de ligante (moléculas que interagem com nanopartículas), solvente (mudando a constante dielétrica) e geometria (mudando condições de energia em sua superfície). Com isso, pode-se, ao avaliar as SPR, concluir algumas observações acerca da nanopartícula. Uma mudança de coloração causada pela adição de algum ligante na solução coloidal indica uma interação. O tipo de solvente em que as nanopartículas estão dispersas pode, também, deslocar o comprimento de onda de absorção máxima. É devido às características das AuNP que métodos de síntese são amplamente avaliados, sempre em busca de conhecer e controlar algumas dessas propriedades relativas aos nanomateriais. Atualmente, estudos na área da nanotecnologia focam a síntese controlada de nanopartículas metálicas com diferentes tamanhos, formas e composição química, controlando sua dispersão para aplicações em diversas áreas ^{14, 20, 22-26}.

Neste capítulo, abordaremos os métodos clássicos de síntese e caracterização de nanopartículas de ouro.

2. Desenvolvimento

2.1. Métodos de obtenção das nanopartículas de ouro

Os métodos de obtenção das nanopartículas podem ser separados em físicos (*top-down*), químicos e biológicos (*bottom-up*) (**Figura 3**).

Figura 3: Esquema ilustrativo dos métodos de obtenção das AuNPs



Fonte: elaborado pelos autores.

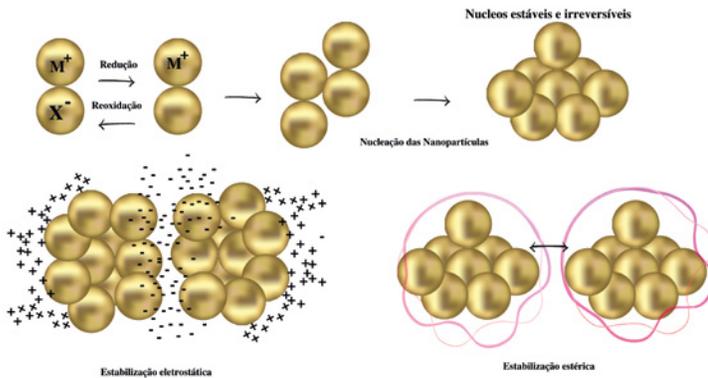
Em relação aos métodos físicos (*top-down*), a partícula inicial possui um tamanho maior (ouro sólido maciço) que a do final do processo. Utilizam-se métodos mecânicos, como moagem, tratamentos termoquímicos, litografia com feixe de elétrons, deposição a vácuo e ablação a laser. Esses tipos de processos de preparação são complexos e demorados, além do alto custo dos equipamentos, e levam a diversos defeitos nas nanopartículas, comprometendo muitas de suas propriedades ²⁷.

Nos métodos químicos (*bottom-up*), as nanopartículas são feitas começando do menor tamanho e crescendo até chegar ao tamanho desejado por nucleação (**Figura 4**). Os métodos químicos utilizados são redox, eletroquímico, fotoquímico, crescimento de semente, síntese modelo, síntese modelo de microemulsão, síntese por micro-ondas etc. Os compostos de ouro, como o ácido cloroáurico, são reduzidos, e o crescimento das partículas é controlado (tamanho e forma) ^{2, 14, 21, 28, 29}.

Alguns métodos de síntese “verde” de nanopartículas vêm sendo desenvolvidos recentemente. São alternativas inovadoras, pois envolvem a síntese biológica, sobretudo, por meio do uso de bactérias, fungos e plantas. Esses processos são de extrema importância porque reduzem ou eliminam o uso de solventes, reagentes e a geração de produtos tóxicos, nocivos à saúde humana ³⁰⁻³².

A maioria dos sistemas contendo nanopartículas de ouro pode sofrer agregação causada pela alta energia da superfície, caso a superfície esteja sem proteção ou passivação ³³. O uso de agentes estabilizantes constitui uma ferramenta para alterar as propriedades da superfície das AuNP, impedindo, assim, que estas formem agregados (**Figura 4**).

Figura 4: Esquema mostrando nucleação e estabilização (eletrostática e estérica) das nanopartículas de ouro



Fonte: elaborado pelos autores.

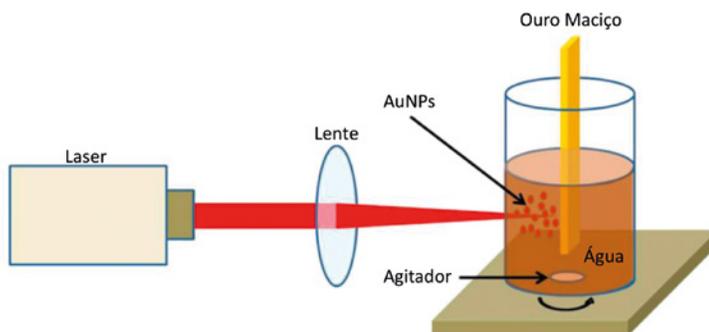
2.1.1. Obtenção de Nanopartículas pelo Método Físico Método síntese metal-vapor

Na síntese em fase vapor, a formação das nanopartículas ocorre na fase gasosa. Esse processo tem sido utilizado nas últimas décadas por muitas empresas em reatores para a fabricação de nanopartículas de carbono ou dióxido de titânio. Nessa técnica, ao se formar uma partícula, esta colide, rapidamente, com um gás inerte num ambiente de baixa pressão, formando tamanhos muito pequenos. Um exemplo dessa forma de produção de nanopartículas envolve a hidrólise de cloretos metálicos em fase gasosa com influência de água³⁴. A reação produz um óxido metálico tendo o gás clorídrico (HCl) como subproduto que pode ser reciclado. Uma variação mais moderna e eficiente na produção de nanopartículas é conhecida como condensação por gás inerte. Nesta, a produção é controlada e o tamanho mais homogêneo³⁴. As partículas são formadas quando átomos oriundos de uma fonte quente perdem rapidamente a energia colidindo com átomos de um gás inerte. Os tamanhos podem ser inferiores a 10 nm e vários metais podem ser sintetizados nesta escala, como Al, Co, Cr, Cu, Fe, Ga, Mg e Ni.

Método síntese ablação a laser

Em sínteses recentes, as AuNPs podem ser preparadas por ablação a laser em meio aquoso biocompatível, o que modifica, fortemente, a química da superfície e as propriedades físicas e biológicas. De maneira simplificada, uma porção de ouro (filme, fios, pedaços maciços) é imersa em meio aquoso e irradiada por laser de alta intensidade, produzindo as nanopartículas de ouro (**Figura 5**). Quando liberadas no meio aquoso, essas nanopartículas coalescem e formam uma solução coloidal de NPs. A ablação por laser em água deionizada, sem agentes ligantes/estabilizantes, leva a soluções NP extremamente estáveis em um estado quase monodisperso. Essa estabilidade é atribuída a um efeito de repulsão elétrica resultante de uma carga negativa das NPs produzidas. As AuNP sintetizadas por ablação a laser podem exibir uma química de superfície única, o que as torna reativas com uma série de novos materiais²⁷.

Figura 5: Técnica de obtenção física de nanopartículas de ouro por ablação a laser



Fonte: adaptada de Rajeshkumar, S. (2013)²⁷.

2.1.2. Obtenção de nanopartículas pelo método químico

As técnicas *bottom-up* são, também, conhecidas como métodos químicos. Características como o tamanho, a morfologia, a estabilidade e a funcionalidade da superfície das nanopartículas dependem não apenas do método de síntese empregado como também das condições experimentais (concentração do íon metálico, velocidade de redução, temperatura, uso e concentração de agentes estabilizantes etc.).

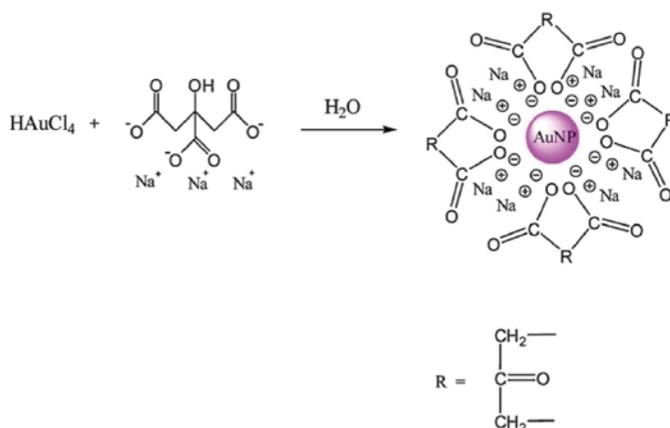
O ácido cloroáurico, $[HAuCl_4]$, é utilizado como fonte de íons Au(III) e, na presença de citrato de sódio e borohidreto de sódio, são os métodos clássicos de preparo de nanopartículas de ouro. Outro método utilizado é o de redução química dos íons metálicos no interior de micelas formadas por surfactantes e usadas como nanorreatores (método de troca de ligante).

Método de Turkevich-Frens

O método clássico de síntese controlada e reproduzível para nanopartículas de ouro foi estabelecido por Turkevich em 1951. Esse método é conhecido pelo método do citrato^{35, 36}. Até hoje, o protocolo de síntese original foi modificado inúmeras vezes, permitindo a fabricação de nanopartículas em uma ampla gama de tamanhos.

Resumidamente, ocorre uma reação de oxirredução em meio aquoso, em que os íons de ouro (III) são reduzidos pelo citrato, que atua como agente redutor e estabilizante. O amplo uso do Método de Turkevich está associado ao fato dele ser atóxico, de simples manipulação, fácil execução, baixo custo, rápido, seguro e reprodutível (**Figura 6**). As nanopartículas formadas pelo método de citrato possuem boa homogeneidade no tamanho e dispersão das nanopartículas, com tamanho em torno de 20 nm.

Figura 6: Síntese de AuNP pelo método de Turkevich

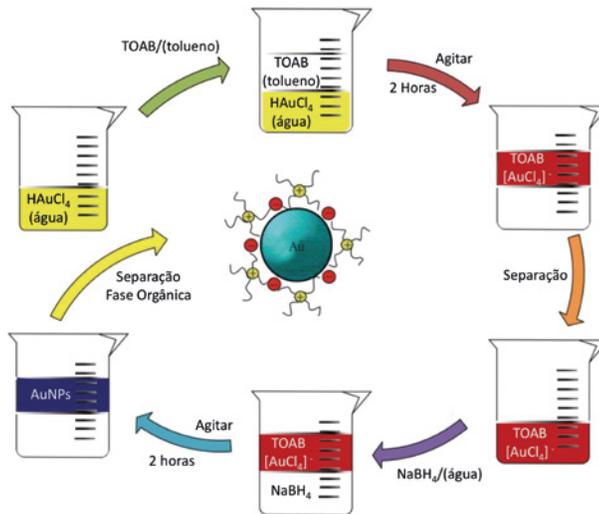


Fonte: adaptada de Zhao, P. (2013) ³⁷.

Método de Brust-Schiffrin

O método Brust-Schiffrin (**Figura 7**) foi o primeiro a preparar AuNP estabilizadas com tiolatos por síntese *in situ*, produzindo AuNP mais hidrofóbicas, com diâmetros na faixa de 1,0 a 8,0 nm ²⁴. Derivados de ouro são reduzidos com borohidreto de sódio em solvente orgânico e na presença de ligantes de tiol, usando um sistema líquido-líquido bifásico ou um solvente adequado. Essas AuNP são estabilizadas por ligações relativamente fortes de Au-S ²⁵.

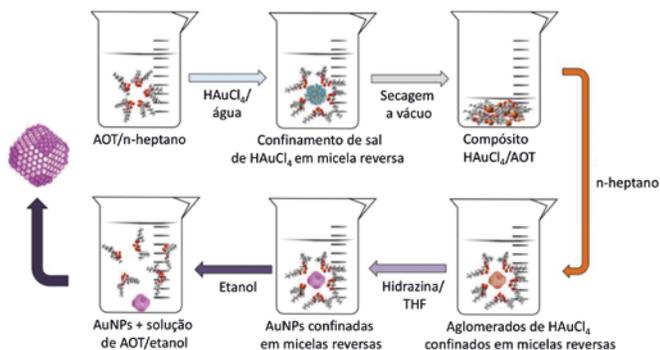
Figura 7: Síntese de AuNP pelo método de Brust



Fonte: adaptada de Calandra, P. (2010) ²⁵.

Método de Reação de Troca de ligante

O método de preparo de AuNP mais comumente usado é a reação de troca de ligante de superfície (**Figura 8**), que foi introduzida, pela primeira vez, por Murray e colaboradores ³⁸. Nessa reação, os ligantes iniciais na superfície de nanopartículas são substituídos por ligantes funcionalizados, assim nanopartículas multifuncionalizadas podem ser obtidas de maneira controlada. Quando a superfície de nanopartículas apresenta grupos quimicamente reativos, ligantes adicionais podem ser conjugados por meio de protocolo convencional, fornecendo uma segunda via para a funcionalização de partículas.

Figura 8: Síntese de AuNP pelo método de Troca de Ligantes

Fonte: adaptada de Calandra, P. (2010)²⁵.

2.1.3. Obtenção de nanopartículas pelo método Biológico

A síntese verde busca a utilização de compostos naturais como agentes redutores, proporcionando uma alternativa sustentável aos produtos tóxicos.

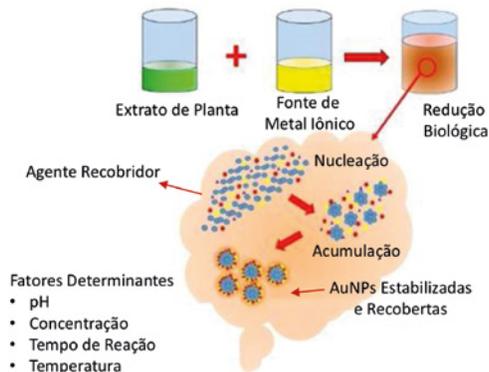
São utilizados reagentes naturais, tais como vitaminas, açúcares, extratos de plantas, polímeros biodegradáveis e microrganismos como agentes redutores em vez de solventes orgânicos e agentes estabilizantes^{12, 31, 39-42}.

Uma das rotas biológicas dentro da síntese verde é o uso de extratos obtidos com base em partes da planta, e o agente ativo nesse tipo de síntese é atribuído aos compostos fenólicos, flavonoides, aminoácidos, terpenoides, ácido cítrico, grupos funcionais (álcoois, aldeídos, aminas), compostos heterocíclicos, polissacarídeos e ácido tânico e outros (Figura 9). A síntese verde se mostra interessante e os métodos de síntese têm sido amplamente estudados, uma vez que são simples, de baixo custo, reprodutíveis e muitas vezes resultam em materiais mais estáveis, biocompatíveis e biodegradáveis⁴²⁻⁴⁵.

A natureza do extrato da planta, sua concentração, a concentração do sal de metal, o pH, a temperatura e o tempo de reação são conhecidos

por afetarem a velocidade de síntese de nanopartículas, a quantidade e outras características. As rotas sintéticas verdes visam otimizar condições experimentais levando a um aumento do rendimento e da velocidade de reação quando comparados com os padrões de síntese por rotas tradicionais.

Figura 9: Síntese de AuNP pelo método biológico



Fonte: adaptada de SHAH, M. (2015) ⁴².

2.2. Métodos de caracterização das nanopartículas de ouro

As nanopartículas de ouro (AuNPs) são uma fascinante classe de nanomateriais que podem ser usadas para uma ampla gama de aplicações biomédicas, incluindo bioimagem, ensaios de fluxo lateral, detecção e purificação ambiental, armazenamento de dados, entrega de medicamentos, biomarcadores, catálise, sensores químicos, detecção de DNA, entre outros.

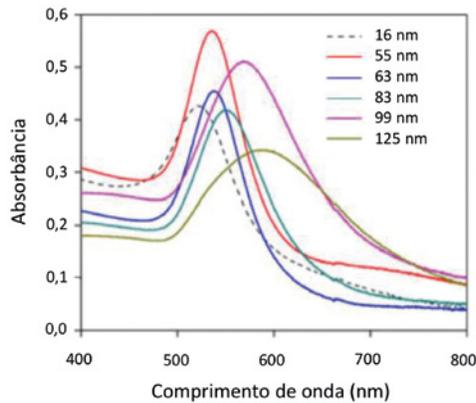
As AuNPs são caracterizadas principalmente pelas técnicas: espectroscopia UV-vis, espalhamento dinâmico de luz, potencial zeta, emissão de fluorescência, espectroscopia na região do infravermelho, eletroquímica, microscopia eletrônica de varredura, espectroscopia de energia dispersiva e microscopia eletrônica de transmissão, que se mostraram ser técnicas muito úteis para essa finalidade⁴⁶⁻⁵⁴.

Espectroscopia na região do ultravioleta e visível (UV-Vis)

Uma vez que a ressonância de plasmon de superfície (SPR) origina um espectro de extinção o qual depende do tamanho, forma e estado de agregação das nanopartículas de ouro, a espectroscopia de UV-vis se torna uma técnica útil que permite calcular o tamanho, a concentração e o nível de agregação das partículas^{21, 50}. A SPR das AuNPs é claramente vista como um pico entre 520 nm e 580 nm, e um modelo matemático baseado na teoria de Mie pode descrever o tamanho e a concentração das nanopartículas com tamanhos entre 5,0 nm e 100 nm baseando-se nesse pico⁴¹. De acordo com a teoria de Mie, a formação de bandas simétricas e agudas de SPR para AuNPs sugere a formação de nanopartículas esféricas, dispersas em solução aquosa e sem sinais de agregação. O comprimento de onda do pico de absorvância aumenta conforme o diâmetro da AuNP aumenta (**Figura 10**). Para partículas com o mesmo tamanho, mas com formas variadas, o espectro de absorvância se desloca, significativamente, para a região do vermelho⁴⁵.

A técnica de UV-Vis também pode ser utilizada para avaliar a funcionalização das nanopartículas de ouro. Ao se adicionar ligantes na superfície das AuNPs, e mantendo o diâmetro do núcleo metálico, o espectro de absorvância deslocará para comprimentos de onda maiores (deslocamento batocrômico)⁵⁰. Esse deslocamento pode ser utilizado para identificar diferentes proporções do agente funcionalizador, e é resultante do aumento no índice de refração local na superfície da nanopartícula de ouro⁵⁵.

Figura 10: Espectro de absorção das AuNP com diferentes tamanhos e deslocamentos do comprimento de onda



Fonte: adaptado de Lopez-Munoz, G. A. (2012)⁵⁶

Espalhamento Dinâmico de Luz

Espalhamento dinâmico de luz é uma técnica analítica utilizada para mensurar o tamanho médio, a distribuição de tamanho e o índice de polidispersão de partículas. A performance da técnica está relacionada ao *setup* experimental e às características das amostras. Usualmente, para avaliar AuNPs, o sistema é equipado com um laser de He-Ne de comprimento de onda de 633 nm e as medidas são realizadas em temperatura ambiente; o resultado é uma média de várias corridas do equipamento. As partículas são iluminadas pelo laser e a variação do espalhamento da luz é monitorada. A técnica nos permite medir o diâmetro hidrodinâmico das partículas, o que inclui a nanopartícula, agentes funcionalizantes e a camada de solvente associada à partícula^{43, 48}.

A técnica pode ser aplicada em soluções diluídas ou concentradas, mas é limitada para identificação de misturas devido à contribuição das partículas na intensidade do espalhamento da luz^{48, 57}. A agregação das nanopartículas de ouro pode ser avaliada por meio do alargamento do pico indicando o tamanho hidrodinâmico. Por exemplo, o processo de aglomeração pode ser resultante da troca de ligantes na

superfície das AuNPs, o que pode acarretar um aumento significativo de tamanho médio das partículas de ~50 nm para ~140 nm, e, com o aumento da concentração do ligante, o tamanho médio pode aumentar ainda mais, apresentando múltiplas populações com uma delas a aproximadamente 960 nm⁵⁸.

Potencial Zeta

O potencial zeta (ZP) é uma propriedade física exibida por qualquer partícula em suspensão. Pode ser usado para otimizar as formulações de suspensões e emulsões. Um potencial zeta mínimo de -30,0 mV é essencial para uma boa estabilidade^{47, 59}. AuNPs produzidas pela redução do ácido cloroáurico por meio de citrato de sódio resultam em um valor médio de ZP de -34,9 mV⁶⁰; AuNPs produzidas por meio de síntese verde usando o extrato *Eclipta prostrata* resultaram em um valor de -17,4 mV^{33, 61}. Esses valores indicam que as moléculas de cobertura presentes na superfície de AuNPs são compostas, principalmente, de grupos carregados negativamente e conferem estabilidade moderada às nanopartículas.

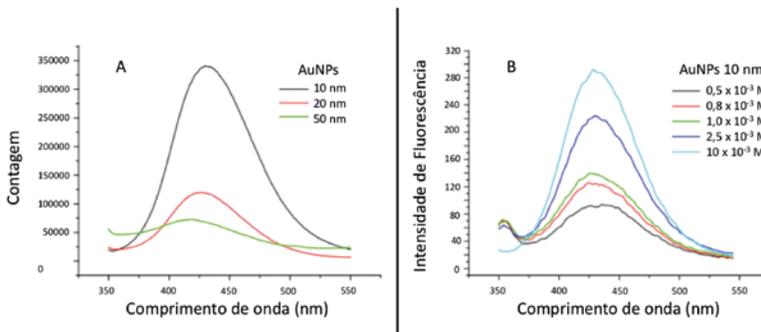
Emissão de Fluorescência

Quando uma molécula absorve um fóton na região ultravioleta ou visível (UV-Vis) (190 - 800 nm), ocorre uma transição eletrônica dentro da molécula. Essa transição envolve a transferência de um elétron do estado fundamental singleto (S_0) para o estado excitado singleto (S_1). O retorno da molécula para o estado fundamental pode ocorrer de três maneiras distintas: por desativação colisional, fluorescência ou fosforescência. O mecanismo de fluorescência envolve o retorno do elétron do estado excitado singleto ao estado fundamental acompanhado pela emissão de um fóton de energia mais baixa (maior comprimento de onda) que o fóton absorvido; a perda de energia é devida ao relaxamento vibracional enquanto no estado excitado⁵¹.

O espectro de fluorescência das nanopartículas de ouro pode ser medido por meio da excitação da amostra com comprimento de onda de 308 nm e o monitoramento do pico de fotoluminescência que apare-

ce, aproximadamente, em 423 nm, permitindo inferir o tamanho das nanopartículas (**Figura 11-A**). A incidência da luz em 308 nm leva à excitação do plasmon de superfície, assim como dos elétrons do nível energético d . Além disso, em análises quantitativas com tamanho fixo de AuNPs, a intensidade de fluorescência do espectro aumenta linearmente com o aumento da concentração com correlação de $R^2 = 0,995$ (**Figura 11-B**). Assim, podemos dizer que a intensidade da banda de emissão de fluorescência é dependente da concentração e do tamanho da partícula⁶².

Figura 11: (A) Espectro de emissão de fluorescência de uma solução de AuNPs; (B) Pico de emissão de fluorescência para AuNPs com 10 nm de diâmetro em diferentes concentrações



Fonte: adaptada de Abdelhalim, M. (2012)⁶².

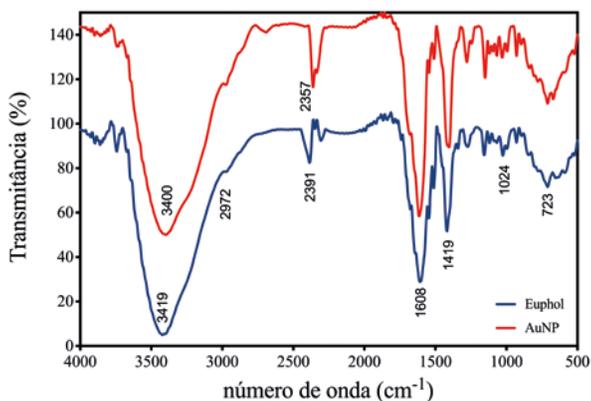
Espectroscopia na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

O FTIR é uma técnica amplamente utilizada para investigar os possíveis grupos funcionais envolvidos na formação de AuNPs, que dão origem às assinaturas bem conhecidas na região Infravermelho (IV) do espectro eletromagnético. Os espectros de FTIR para as AuNPs são diretamente dependentes de seus precursores (citrato, luminol, extratos de plantas, fungos e outros agentes redutores)⁵².

Diversos autores^{2, 30, 32, 52, 63, 64} têm relatado que a redução de íons ouro está intimamente relacionada à presença dos grupos funcionais carboxílico, amina, fosfato e hidroxila²⁹. Esses grupos atuam como agentes redutores para a redução do íon metálico para nanopartículas metálicas. Especialmente a conversão do grupo CO dos terpenos para o grupo –COO pode ser responsável pela redução de Au⁺ para Au⁰³⁹.

Na Figura 12, é apresentado o espectro de FTIR do látex da *Euphorbia tirucalli*, que simplifiadamente neste trabalho é chamado de Eufol, na mesma figura é apresentado o espectro das nanopartículas de ouro (AuNPs) produzidas por meio de uma reação de redução ocasionada por este látex. Durante o processo de produção das AuNPs, o recobrimento da superfície das partículas por compostos antioxidantes do tipo flavonoides e polifenóis provenientes do Eufol aumenta sua estabilidade⁶⁴. Esse processo de redução é acompanhado pelo deslocamento do pico no número de onda de 3.419 cm⁻¹ para 3.400 cm⁻¹, o qual é atribuído a vibrações de estiramento do grupamento hidroxila (νOH). Um comportamento semelhante é observado com o deslocamento de 1.456 para 1.419 cm⁻¹ em decorrência das deformações de flexão do grupamento metileno (δCH) e estiramento da ligação C-C⁶⁴. Outros grupamentos funcionais que desempenham papéis importantes na produção e estabilização de AuNPs são as aminas primárias (νNH) e carbonilas (νC=O), que se encontram extensamente presentes em compostos polifenólicos. No espectro de FTIR, destacam-se também as vibrações de estiramento do grupo funcional alcano (ν_aCH₂), que ocorre na região de 2.972 cm⁻¹, e do grupo amida primária com suas bandas em 1.617 cm⁻¹ (νC=O) e 1.405 cm⁻¹ (δCH).

Figura 12: Espectro de FTIR de nanopartículas de ouro com látex de euphol em micro-ondas



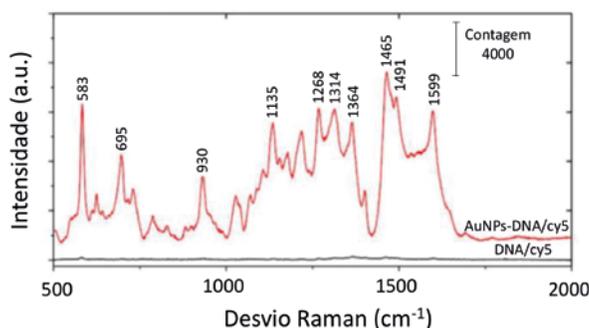
Fonte: Lunardi, C.N. (2018) ⁶⁴.

Espectroscopia Raman amplificada por superfície (SERS)

A espectroscopia Raman intensificada por superfície aumenta o espalhamento Raman de moléculas adsorvidas na superfície de metais, sendo efetiva para o estudo das propriedades de superfície interfaciais, como a interação de biomoléculas com a superfície de metais⁶⁵. Os processos de modificação química das superfícies podem ser relevantes para estabilizar o substrato, criar afinidade específica com o objeto de estudo, servir de padrão para medidas quantitativas e melhorar a reprodutibilidade^{25, 66-70}. O fator contribuinte dominante para a intensificação do espalhamento Raman é o efeito de Ressonância Plasmônica de Superfície (SPR), que as nanopartículas metálicas apresentam. Esse efeito é abordado, preferencialmente, nas nanopartículas de metais nobres como o ouro e a prata por serem estáveis no ar e apresentarem SPR nos comprimentos de onda mais utilizados para análises de Raman⁷¹. A intensificação do espalhamento Raman pode chegar à ordem de magnitude de 10^{15} vezes comparado com o sinal fraco inerente das moléculas, sendo dependente do tamanho e forma das nanopartículas de ouro⁷². Na Figura 13, observa-se um exemplo de caracterização por meio da técnica de Raman apresentando o efeito

SERS da associação de corante e DNA à superfície de nanopartículas de ouro, amplificando o sinal de Raman e permitindo o uso desta como sensor⁶⁶.

Figura 13: Espectros Raman de oligonucleotídeos de DNA modificado cy5 puro (sem nanopartículas de ouro, preto) e nanossondas Au (nanopartículas de ouro conjugadas com oligonucleotídeos DNA cy5, vermelho)



Fonte: adaptada de Draz, M. S. (2016)⁶⁶.

Eletroquímica

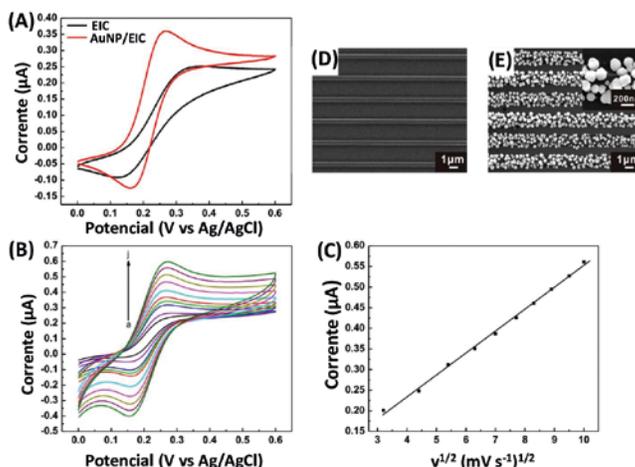
A caracterização eletroquímica é uma técnica utilizada, geralmente, quando se quer avaliar a atividade de um sensor ou de algum substrato condutor após a sua modificação. A voltametria cíclica é importante para obter informações sobre o potencial redox e as reações eletroquímicas de soluções de analitos. Nessa técnica, a voltagem é medida entre o eletrodo de referência e o eletrodo de trabalho, enquanto a corrente é medida entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo auxiliar. As medidas obtidas são inseridas em gráficos de corrente vs. voltagem, obtendo um gráfico conhecido como voltamograma. Durante o processo cíclico, parâmetros importantes a serem avaliados são os picos catódicos e anódicos, e, quando houver correspondência entre eles, o gráfico fornece informações sobre a reversibilidade da reação⁴³. A velocidade de varredura é um fator crítico, pois sua variação produz resultados diversos correspondentes devido à necessidade de tempo para que as reações químicas ocorram de forma significativa^{5, 9, 73}.

Nanopartículas de ouro podem ser diretamente eletrodepositadas em eletrodos, tornando o processo eletroquímico multifuncional, ou seja, a técnica eletroquímica é utilizada para a modificação com AuNPs e posterior caracterização do material condutor. A modificação do eletrodo com AuNP geralmente consiste em um processo de nucleação e crescimento divididos em duas etapas eletroquímicas de diferentes potenciais. A etapa de nucleação é tipicamente realizada em potencial mais elevado determinando a uniformidade e a distribuição das AuNPs, e o crescimento em um potencial menor determina precisamente o tamanho das nanopartículas até sua coalescência^{28, 33, 74}. Por exemplo, Eletrodos Interdigitados de Carbono nanométrico (EIC) foram recobertos com AuNPs, de diâmetro entre 90 nm e 150 nm (Figura 14 D, E), em duas etapas de eletrodeposição: primeiro uma polarização direta de -0.9 V vs. Ag/AgCl é aplicada por 20 s promovendo a nucleação uniforme, seguida da aplicação de uma polarização reversa mais baixa de -0.7 V vs. Ag/AgCl por 40 s, para controlar o crescimento e, conseqüentemente, o tamanho das AuNPs. O tempo de cada etapa deve ser otimizado de acordo com a aplicação desejada. Tamanho, uniformidade e densidade das nanopartículas de ouro tendem a aumentar juntamente com o tempo de crescimento, que deve ser limitado para impedir a coalescência das AuNPs^{46, 73}.

A presença de AuNPs pode ser determinada por meio da análise e da comparação do perfil do voltamograma cíclico antes e depois da funcionalização do substrato. Essa etapa de caracterização pode ser realizada em solução de eletrólito suporte (H_2SO_4 , $0,5 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$) ou em solução com par redox como $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}/[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ em $0,1 \text{ mol} \times \text{L}^{-1}$ de KCl, que amplifica o sinal de corrente assegurando a sensibilidade do sensor⁷⁴. A Figura 14 A mostra a diferença entre o sinal eletroquímico dos sensores EIC e AuNP/EIC. A corrente é medida em microampere (μA) e o potencial é varrido de 0,0 a 0,6 volts com velocidade de $50 \text{ mV} \times \text{s}^{-1}$. A intensidade da corrente é maior na presença das AuNPs devido ao aumento de transferência eletrônica que o ouro proporciona na superfície, e o potencial de separação entre os picos catódicos e anódicos diminui de 190 mV para 85 mV. Os picos de corrente em rela-

ção ao potencial são dependentes da velocidade de varredura, como evidenciado na Figura 14 B, e a relação do pico de corrente com a raiz quadrada da velocidade de varredura exibe um gráfico com relação linear (**Figura 14 C**), sugerindo um processo de difusão controlada quasi-reversível^{5, 46}.

Figura 14: (A) Voltamograma cíclico de EIC e AuNP/EIC em 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl com velocidade de varredura de $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. (B) Voltamograma cíclico de AuNP/EIC em 10 mM $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ em solução de $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ de KCl com velocidade de varredura variável, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 $\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$ (curvas a - j respectivamente). (C) Relação entre o pico de corrente e a raiz quadrada da velocidade de varredura. Imagens de Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV); (D) EIC, e (E) AuNP/EIC



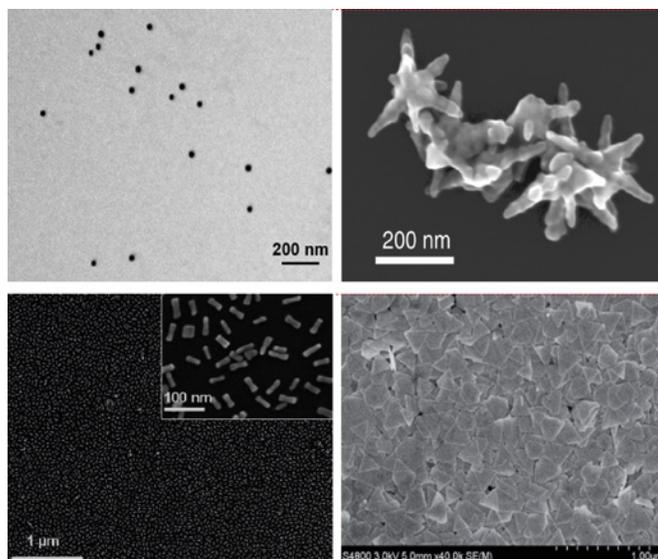
Fonte: adaptada de Rocha F.S (2015)⁷⁴ e Sharma D. (2017)¹⁷.

Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As análises de MEV apresentam uma indicação clara sobre a forma e o tamanho das nanopartículas (**Figura 15**). As AuNPs mostradas apresentam dimensões variando entre 25 nm e 40 nm, e essas partículas apresentam formatos esféricos, bastões, estrelas e triângulo. Na literatura, também são descritas AuNPs no formato de discos, prismas

e outros⁶⁰. Para se controlar a forma e o tamanho dessas partículas, utilizam-se alguns agentes de controle, tais como surfactantes orgânicos, entre eles o brometo de hexadeciltrimetilamônio (CTAB), cloreto de hexadeciltrimetilamônio (CTAC); polímeros como polivinilpirrolidona, (PVP), poli (cloreto de dialildimetilamônio) (PDAC) e polietilenimina (PEI); sais inorgânicos como nitrato de prata (AgNO_3), bem como moléculas ou íons pequenos, por exemplo citrato.

Figura 15: Nanopartículas de ouro observadas pela técnica de microscopia eletrônica de varredura. As partículas mostraram forma esférica, bastões, estrela e triângulos. Escala de magnificação 20,000×



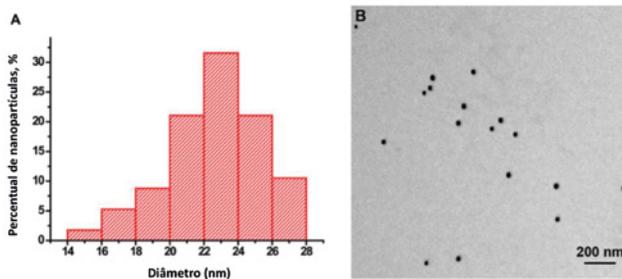
Fontes: Sotnikov, D. (2015), Salinas, K. (2014), Satija, J. (2010), Liebig, F. (2016)⁷⁵⁻⁷⁸.

Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão é uma ferramenta muito poderosa para a ciência dos materiais. Essa tecnologia pode nos informar sobre a estrutura, cristalização, morfologia e estresse de uma substância. Nessas técnicas de MET e MEV, é amplamente considerado o padrão ouro para a caracterização de nanopartículas. A principal diferença entre as duas técnicas é a maneira como as imagens das nanopartículas são resolvidas. O MEV produz imagens 3D precisas de partículas na dispersão enquanto o MET produz imagens 2D que requerem interpretação adicional ⁵³.

Materiais como vírus, nanopartículas ou agregados de polímeros dificilmente requerem qualquer preparação. No caso de estruturas maiores, estas são geralmente cortadas em seções finas (<100 nm) para torná-las transparentes para o feixe de elétrons. Como pode ser observado na Figura 17, a análise indicou AuNPs esféricas e monodispersas com tamanho entre 15 nm e 30 nm ^{30, 53}.

Figura 17: Nanopartículas de ouro. (A) Histograma de distribuição de tamanho de partícula; (B) Uma imagem de nanopartículas de ouro a partir da micrografia eletrônica de transmissão



Fonte: adaptada de Sotnikov, D. (2015) ⁷⁵.

3. Considerações Finais

Estudos envolvendo nanopartículas de ouro (AuNPs) vêm contribuindo de forma significativa para o campo da nanotecnologia, que é evidenciado a partir de suas inúmeras aplicações existentes e de muitas outras importantes que podem ser esperadas em um futuro próximo. As AuNPs existem há muito tempo, mas, nas duas últimas décadas, as suas aplicações dispararam devido ao avanço das ferramentas analíticas em nanoescala.

Como foi destacado neste capítulo, as AuNPs podem ter sua superfície facilmente modificada, permitindo o seu uso em diversas aplicações, tais quais: na construção de biossensores, sistema de liberação gradativa de fármacos, lubrificantes, células solares, catálise e outros campos interdisciplinares da física, química, biologia, medicina e ciência dos materiais.

Um esforço considerável tem sido dedicado às técnicas de síntese para construir nanoestruturas de ouro com uniformidade de distribuição espacial e estabilidade melhoradas. Essas partículas são sintetizadas convencionalmente por meio dos métodos de Turkevich, Brust-Schiffrin e outros, e mais recentemente tem-se preferido a utilização de métodos verdes, pois eles são reprodutivos, eficientes e ecológicos. Esse método de síntese favorável ao meio ambiente para AuNPs pode ter um grande potencial na produção em grande escala para atender a crescentes demandas comerciais e industriais por esses materiais nos campos de entrega biomédica, farmacêutica, cosmética, alimentícia e medicamentosa.

4. Referências

1. CAMPOS, W. N. D. S. et al. Síntese e caracterização de nanopartículas de ouro conjugadas com curcumina e seus efeitos na osteoartrite experimental induzida. **Ciência Rural**, 47, 2017.
2. CUI, H. et al. Synthesis, characterization, and electrochemiluminescence of luminol-reduced gold nanoparticles and their application in a hydrogen peroxide sensor. **Chemistry**, 13 (24) 6975-6984, 2007.
3. DREADEN, E. C. et al. Tamoxifen–Poly(ethylene glycol)–Thiol Gold Nanoparticle Conjugates: Enhanced Potency and Selective Delivery for Breast Cancer Treatment. **Bioconjugate Chemistry**, 20 (12) 2247-2253, 2009.
4. JAQUE, D. et al. Nanoparticles for photothermal therapies. **Nanoscale**, 6 (16) 9494-9530, 2014.
5. KUMAR, A. et al. Amperometric microsensor based on nanoporous gold for ascorbic acid detection in highly acidic biological extracts. **Anal Chim Acta**, 1095 61-70, 2020.
6. HUANG, X. et al. Gold nanoparticles: interesting optical properties and recent applications in cancer diagnostics and therapy. **Nanomedicine**, 2 (5) 681-693, 2007.
7. LIU, H. et al. Size-selective electrodeposition of meso-scale metal particles: a general method. **Electrochimica Acta**, 47 (5) 671-677, 2001.
8. OLIVEIRA, D. et al. Gold Nanoparticle Conjugation with Microtubules for Nanobiostructure Formation. **Journal of Bionanoscience**, 12 (2) 271-277, 2018.
9. PEI, R. et al. Amplification of antigen–antibody interactions based on biotin labeled protein–streptavidin network complex using impedance spectroscopy. **Biosensors and Bioelectronics**, 16 (6) 355-361, 2001.

10. RIAZ, S. et al. Effect of Flavonoid-Coated Gold Nanoparticles on Bacterial Colonization in Mice Organs. **Nanomaterials (Basel, Switzerland)**, 10 (9), 2020.
11. SILVA, L. Z. et al. Star-shaped amino-functionalized poly(glycerol methacrylate)-stabilized gold nanoparticle composites with catalytic activity for reduction of 4-nitrophenol. **Journal of Molecular Liquids**, 319 114119, 2020.
12. SERAFÍN, V. et al. Disposable immunoplatforms for the simultaneous determination of biomarkers for neurodegenerative disorders using poly(amidoamine) dendrimer/gold nanoparticle nanocomposite. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, DOI:10.1007/s00216-020-02724-3 10.1007/s00216-020-02724-3, 2020.
13. SILVA, A. T. B. et al. Nano-assembled supramolecular films from chitosan-stabilized gold nanoparticles and cobalt(II) phthalocyanine. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 24 1237-1245, 2013.
14. BRONDANI, D. et al. Gold nanoparticles in an ionic liquid phase supported in a biopolymeric matrix applied in the development of a rosmarinic acid biosensor. **Analyst**, 136 (12) 2495-2505, 2011.
15. DAVID, H.-S. et al. Metal-Nanoparticles Based Electroanalysis. **Electroanalysis**, 14 (18) 1225-1235, 2002.
16. MAJUMDAR, R. et al. Acacia nilotica (Babool) leaf extract mediated size-controlled rapid synthesis of gold nanoparticles and study of its catalytic activity. **International Nano Letters**, 3 (1) 53, 2013.
17. RASTOGI, P. K. et al. Synthesis and characterization of gold nanoparticles incorporated bentonite clay for electrocatalytic sensing of arsenic(III). **Journal of Chemical Sciences**, 128 (3) 349-356, 2016.
18. VAN ECK, N. J.; WALTMAN, L. Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping. **Scientometrics**, 84 (2) 523-538, 2010.

19. HOWARD, D. et al. Chemical Mechanisms of Nanoparticle Radiosensitization and Radioprotection: A Review of Structure-Function Relationships Influencing Reactive Oxygen Species. **Int J Mol Sci**, 21 (2) 579, 2020.
20. TOMA, H. E. et al. The coordination chemistry at gold nanoparticles. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 21 1158-1176, 2010.
21. LINK, S.; EL-SAYED, M. A. Size and Temperature Dependence of the Plasmon Absorption of Colloidal Gold Nanoparticles. **The Journal of Physical Chemistry B**, 103 (21) 4212-4217, 1999.
22. CESANA, R. et al. Synthesis and characterization of nanocomposite based on reduced graphene oxide-gold nanoparticles-carbon dots: electroanalytical determination of dihydroxybenzene isomers simultaneously. **Journal of Nanoparticle Research**, 22 (10) 336, 2020.
23. AMENDOLA, V.; MENEGHETTI, M. Size Evaluation of Gold Nanoparticles by UV-vis Spectroscopy. **The Journal of Physical Chemistry C**, 113 (11) 4277-4285, 2009.
24. BRUST, M. et al. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase Liquid-Liquid system. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, 0 (7) 801-802, 1994.
25. CALANDRA, P. et al. Metal Nanoparticles and Carbon-Based Nanostructures as Advanced Materials for Cathode Application in Dye-Sensitized Solar Cells. **International Journal of Photoenergy**, 2010 15, 2010.
26. TENÓRIO, F. S. et al. Chitosan hydrogel covalently crosslinked by gold nanoparticle: Eliminating the use of toxic crosslinkers. **Journal of Applied Polymer Science**, 138 (6) 49819, 2021.
27. XU, X. et al. Fabrication of Gold Nanoparticles by Laser Ablation in Liquid and Their Application for Simultaneous Electrochemical Detection of Cd²⁺, Pb²⁺, Cu²⁺, Hg²⁺. **ACS Applied Materials & Interfaces**, 6 (1) 65-71, 2014.

28. MOZAFFARI, S. et al. Colloidal nanoparticle size control: experimental and kinetic modeling investigation of the ligand–metal binding role in controlling the nucleation and growth kinetics. **Nanoscale**, 9 (36) 13772-13785, 2017.
29. RAJESHKUMAR, S. et al. Seaweed-mediated synthesis of gold nanoparticles using *Turbinaria conoides* and its characterization. **Journal of Nanostructure in Chemistry**, 3 (1) 44, 2013.
30. GURUNATHAN, S. et al. A green chemistry approach for synthesizing biocompatible gold nanoparticles. **Nanoscale Research Letters**, 9 (1) 248, 2014.
31. KUMAR, K. P. et al. Green synthesis of gold nanoparticles with *Zingiber officinale* extract: Characterization and blood compatibility. **Process Biochemistry**, 46 (10) 2007-2013, 2011.
32. TIDKE, P. R. et al. Fungus-mediated synthesis of gold nanoparticles and standardization of parameters for its biosynthesis. **IEEE Trans Nanobioscience**, 13 (4) 397-402, 2014.
33. BASSO, C. R. et al. A Study of the Effects of pH and Surfactant Addition on Gold Nanoparticle Aggregation. **J Nanosci Nanotechnol**, 20 (9) 5458-5468, 2020.
34. SHIMIZU, Y. Diameter control of gold nanoparticles synthesized in gas phase using atmospheric-pressure H₂/Ar plasma jet and gold wire as the nanoparticle source: Control by varying the H₂/Ar mixture ratio. **AIP Advances**, 7 (1) 015316, 2017.
35. TURKEVICH, J. et al. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. **Discussions of the Faraday Society**, 11 (0) 55-75, 1951.
36. FRENS, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions. **Nature Physical Science**, 241 (105) 20, 1973.
37. ZHAO, P. et al. State of the art in gold nanoparticle synthesis. **Coordination Chemistry Reviews**, 257 (3) 638-665, 2013.

38. HOSTETLER, M. J. et al. Dynamics of Place-Exchange Reactions on Monolayer-Protected Gold Cluster Molecules. **Langmuir**, 15 (11) 3782-3789, 1999.
39. DUBEY, S. P. et al. Tansy fruit mediated greener synthesis of silver and gold nanoparticles. **Process Biochemistry**, 45 (7) 1065-1071, 2010.
40. GANESH KUMAR, V. et al. Facile green synthesis of gold nanoparticles using leaf extract of antidiabetic potent *Cassia auriculata*. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, 87 (1) 159-163, 2011.
41. MITTAL, A. K. et al. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, 31 (2) 346-356, 2013.
42. SHAH, M. et al. Green Synthesis of Metallic Nanoparticles via Biological Entities. **Materials**, 8 (11) 7278-7308, 2015
43. AHMED, H. B. et al. Heatless synthesis of well dispersible Au nanoparticles using pectin biopolymer. **International Journal of Biological Macromolecules**, 91 208-219, 2016.
44. VILAR, C. J. F. et al. Effect of Gold Nanoparticle on 5-Fluorouracil-Induced Experimental Oral Mucositis in Hamsters. **Pharmaceutics**, 12 (4) 304, 2020.
45. YUE, H. L. et al. Green synthesis and physical characterization of Au nanoparticles and their interaction with bovine serum albumin. **Colloids Surf B Biointerfaces**, 122 107-114, 2014.
46. SHARMA, D. et al. Development of a Sensitive Electrochemical Enzymatic Reaction-Based Cholesterol Biosensor Using Nano-Sized Carbon Interdigitated Electrodes Decorated with Gold Nanoparticles. **Sensors (Basel, Switzerland)**, 17 (9) 2128, 2017.
47. LUNARDI, C. N. et al. Experimental methods in chemical engineering: Zeta potential. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, n/a (n/a), 2020.

48. LI, H. et al. Experimental Methods in Chemical Engineering: Particle Size Distribution by Laser Diffraction—PSD. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 97 (7) 1974-1981, 2019.
49. LEFEBVRE, J. et al. Experimental methods in chemical engineering: X-ray photoelectron spectroscopy-XPS. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 97 (10) 2588-2593, 2019.
50. ROCHA, F. S. et al. Experimental methods in chemical engineering: Ultraviolet visible spectroscopy—UV-Vis. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 96 (12) 2512-2517, 2018.
51. GOMES, A. J. et al. Experimental methods in chemical engineering: Fluorescence emission spectroscopy. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 97 (8) 2168-2175, 2019.
52. GUERRERO-PÉREZ, M. O.; PATIENCE, G. S. Experimental methods in chemical engineering: Fourier transform infrared spectroscopy—FTIR. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 98 (1) 25-33, 2020.
53. BRAIDY, N. et al. Experimental methods in chemical engineering: Transmission electron microscopy—TEM. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 98 (3) 628-641, 2020.
54. KHAN, H. et al. Experimental methods in chemical engineering: X-ray diffraction spectroscopy—XRD. **The Canadian Journal of Chemical Engineering**, 98 (6) 1255-1266, 2020.
55. YANG, H. et al. A facile preparative method for Au-core, block copolymer-shell nanoparticles by UV irradiation of polystyrene-block-poly (2-vinyl pyridine)/HAuCl₄ solutions. **J Nanosci Nanotechnol**, 10 (10) 6340-6347, 2010.
56. LOPEZ-MUNOZ, G. A. et al. Thermal diffusivity measurement of spherical gold nanofluids of different sizes/concentrations. **Nanoscale Res Lett**, 7 (1) 423, 2012.
57. CALZOLAI, L. et al. Separation and characterization of gold nanoparticle mixtures by flow-field-flow fractionation. **J Chromatogr A**, 1218 (27) 4234-4239, 2011

58. SUTARIYA, P. G. et al. A simple and rapid creatinine sensing via DLS selectivity, using calix[4]arene thiol functionalized gold nanoparticles. **Talanta**, 147 590-597, 2016.
59. GUPTA, S. et al. Synergistic effect of reductase and keratinase for facile synthesis of protein-coated gold nanoparticles. **J Microbiol Biotechnol**, 25 (5) 612-619, 2015.
60. VERISSIMO, T. V. et al. In vitro cytotoxicity and phototoxicity of surface-modified gold nanoparticles associated with neutral red as a potential drug delivery system in phototherapy. **Materials Science and Engineering: C**, 65 199-204, 2016.
61. RAJAKUMAR, G. et al. Biosynthesis and Biomedical Applications of Gold Nanoparticles Using Eclipta prostrata Leaf Extract. **Applied Sciences**, 6 (8) 222, 2016.
62. ABDELHALIM, M. A. K.; MADY, M. Physical Properties of Different Gold Nanoparticles: Ultraviolet-Visible and Fluorescence Measurements. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, 03 (03), 2012.
63. GANESHKUMAR, M. et al. Green synthesis of pullulan stabilized gold nanoparticles for cancer targeted drug delivery. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc**, 130 64-71, 2014.
64. CORREA-LLANTEN, D. N. et al. Gold nanoparticles synthesized by Geobacillus sp. strain ID17 a thermophilic bacterium isolated from Deception Island, Antarctica. **Microb Cell Fact**, 12 75, 2013.
65. QUESTER, K. et al. SERS Properties of Different Sized and Shaped Gold Nanoparticles Biosynthesized under Different Environmental Conditions by Neurospora crassa Extract. **PLOS ONE**, 8 (10) e77486, 2013.
66. DRAZ, M. S.; LU, X. Development of a Loop Mediated Isothermal Amplification (LAMP) - Surface Enhanced Raman spectroscopy (SERS) Assay for the Detection of Salmonella Enterica Serotype Enteritidis. **Theranostics**, 6 (4) 522-532, 2016.

67. HARAN, G. Single-Molecule Raman Spectroscopy: A Probe of Surface Dynamics and Plasmonic Fields. **Accounts of Chemical Research**, 43 (8) 1135-1143, 2010.
68. DOS SANTOS, J. D. S. et al. Controlling the size and shape of gold nanoparticles in fulvic acid colloidal solutions and their optical characterization using SERS. **Journal of Materials Chemistry**, 15 (29) 3045-3049, 2005.
69. FAN, M. et al. A review on the fabrication of substrates for surface enhanced Raman spectroscopy and their applications in analytical chemistry. **Anal Chim Acta**, 693 (1-2) 7-25, 2011.
70. CAO, B. et al. Facile synthesis of single crystalline gold nanoplates and SERS investigations of 4-aminothiophenol. **CrystEngComm**, 15 (28) 5735-5738, 2013.
71. SHARMA, B. et al. SERS: Materials, applications, and the future. **Materials Today**, 15 (1) 16-25, 2012.
72. KALMODIA, S. et al. Synthesis and characterization of surface-enhanced Raman-scattered gold nanoparticles. **Int J Nanomedicine**, 8 4327-4338, 2013.
73. SANZ, C. G. et al. Electroanalysis of Cefadroxil Antibiotic at Carbon Nanotube/Gold Nanoparticle Modified Glassy Carbon Electrodes. **ChemElectroChem**, 7 (9) 2151-2158, 2020.
74. ROCHA, F. S., Universidade Federal de Uberlândia, 2015.
75. SOTNIKOV, D. et al. Development and Application of a Label-Free Fluorescence Method for Determining the Composition of Gold Nanoparticle-Protein Conjugates. **Int J Mol Sci**, 16 (1) 907-923, 2015.
76. SALINAS, K. et al. Transient extracellular application of gold nanostars increases hippocampal neuronal activity. **J Nanobiotechnology**, 12 31, 2014.

77. SATIJA, J. et al. Emerging use of nanostructure films containing capped gold nanoparticles in biosensors. **Nanotechnol Sci Appl**, 3 171-188, 2010.
78. LIEBIG, F. et al. "Green" gold nanotriangles: synthesis, purification by polyelectrolyte/micelle depletion flocculation and performance in surface-enhanced Raman scattering. **RSC Advances**, 6 (40) 33561-33568, 2016.
79. BINDHANI, B. K. P., A.K. Green synthesis and characterization of gold nanoparticles using leaf extracts of *Withania somnifera* (Linn.) (Ashwagandha). **International Journal of Materials Science and Applications**, 3 (6) 6, 2014.

CAPÍTULO 2

Nanoemulsões: Preparação, Características e Estabilidade

Lucas C. Silva^{1,2}, Leonardo O. B. Silva^{1,2}, Graziella A. Joanitti^{1,2,*}

1. Nanotecnologia e nanoemulsões

A nanotecnologia é a ciência, engenharia e tecnologia conduzidas na escala nanométrica (10^{-9} m), em que muitas propriedades químicas, físicas e mecânicas dos materiais mudam significativamente. Ao estudar as propriedades que regem a escala nanométrica, pode-se, então, pensar em outras formas de utilizá-las para desenvolver novas tecnologias¹. Nesse contexto, os nanocarreadores são materiais nanométricos que podem realizar o transporte de múltiplos fármacos, agentes de imagem e/ou compostos bioativos. Eles possuem uma elevada área de superfície/volume e são utilizados para aumentar a concentração de fármacos em determinado local, promovendo a liberação sustentada destes e minimizando sua degradação¹. Dentre os nanocarreadores mais estudados, podem-se citar nanopartículas poliméricas, nanotubos de carbono, nanopartículas de ouro e nanocarreadores baseados em lipídios, tais como lipossomas e nanoemulsões².

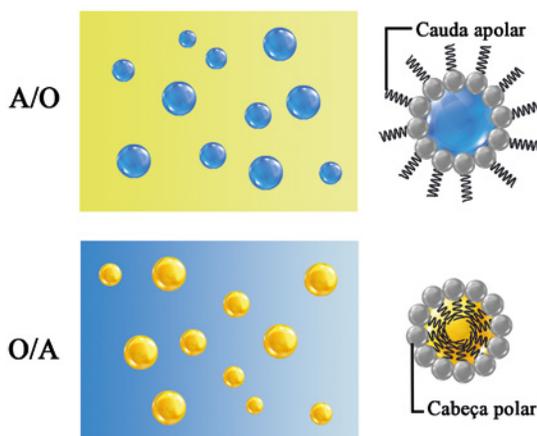
1. Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasil

2. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasil

* E-mail: gjoanitti@unb.br

As nanoemulsões são um tipo de nanopartícula que são dispersões coloidais de líquidos imiscíveis, do tipo água em óleo (A/O) ou óleo em água (O/A), estabilizadas por um surfactante que contribui para a manutenção do tamanho e propriedades em nanoescala (10^{-9} m). A adição de um surfactante é necessária para a formação das nanogotículas, uma vez que essa molécula diminui a tensão interfacial, isto é, a energia superficial por unidade de área entre as fases de óleo e de água. Além disso, pode desempenhar um papel estabilizante para as nanoemulsões, por meio de interações eletrostáticas repulsivas^{1,3}. São sistemas com notória estabilidade cinética e instabilidade termodinâmica. Em outras palavras, apresentam resistência a mudanças físico-químicas no meio (pH, temperatura, pressão, diluição); porém, suas fases se separarão e formarão um complexo heterogêneo com o passar do tempo (geralmente na ordem de anos). A Figura 1 apresenta uma representação esquemática dos sistemas de nanoemulsão O/A e A/O:

Figura 1. Representação esquemática de nanoemulsões óleo em água (O/A) e água em óleo (A/O), em que a parte amarela representa a fase oleosa, e a parte azul, a fase aquosa. As caudas apolares do agente tensoativo ficam sempre voltadas para a fase oleosa, devido às suas características lipofílicas



Fonte: elaborada pelos autores.

Tais sistemas apresentam diversas aplicações na agricultura como alternativa ao uso de agroquímicos, proporcionando a criação de nanodispositivos e nanobiossensores para a manipulação genética e identificação de resíduos de tais compostos em plantas^{4,5}. Seu uso na indústria alimentícia se dá a partir da nanoencapsulação de nutrientes para proteção contra oxidação, variação de pH e retenção de ingredientes voláteis⁴; e na indústria farmacêutica, como sistemas carreadores de moléculas para que ocorra melhor biodistribuição e acúmulo das gotículas no alvo de interesse⁵⁻⁹. Também podem ser utilizadas para carrear medicamentos por meio de barreiras compostas por células ou tecidos, como a barreira hematoencefálica, devido ao seu tamanho reduzido⁴. Essas nanoestruturas também podem ser aplicadas no combate ao câncer. Um dos problemas presentes na forma tradicional de tratamento (quimioterapia) é o desenvolvimento de células tumorais resistentes aos medicamentos^{7,10}. Segundo Minko e colaboradores (2013), essa resistência é adquirida por causa da baixa eficiência do tratamento, que, muitas vezes, não inviabiliza todas as células neoplásicas, favorecendo a proliferação das sobreviventes¹⁰. Para minimizar o desenvolvimento de resistência aos medicamentos, tem se estudado a utilização de nanoestruturas à base de óleo para encapsular os quimioterápicos, visando aumentar sua efetividade⁴ e seu direcionamento para células tumorais, por exemplo^{7,10}.

1.1 Nanoemulsões X Microemulsões

Na literatura, ainda existem divergências de conceitos em relação à definição e à classificação de nanossistemas em nanoemulsão ou microemulsão. Apesar de ambos os sistemas serem dispersões coloidais, há uma clara diferença entre eles. Nanoemulsões são sistemas na escala nanométrica (20 nm a 500 nm) com notória estabilidade cinética e instabilidade termodinâmica. Isso quer dizer que, passado um determinado período, o sistema apresentará duas fases (instabilidade termodinâmica). Em contrapartida, as microemulsões (10 nm - 100 nm) apresentam estabilidade termodinâmica e relativa sensibilidade a mudanças físico-químicas (pH, temperatura, pressão, adição de solvente, diluição) que afetam diretamente sua estabilidade cinética^{1,3}.

Outra grande divergência entre nanoemulsão e microemulsão é a utilização de diagramas de fase pseudoternários para suas formulações. Por meio desse diagrama, é possível identificar os componentes mais adequados e suas proporções relativas para a obtenção de sistemas termodinamicamente estáveis^{1,3}. Geralmente, são apresentados com variações de quantidade de fase oleosa, fase aquosa e surfactante. Tal diagrama é adequado para a obtenção de microemulsões. Porém, considerando-se as características de uma nanoemulsão do tipo óleo em água, por exemplo, o uso desse diagrama para sua formulação se tornaria inadequado. Dentre todos os componentes presentes na nanoemulsão, apenas a variação de dois deles, óleo e surfactante, pode impactar diretamente as características físico-químicas do sistema. Ou seja, uma nanoemulsão do tipo O/A não é expressivamente afetada pela variação de água no sistema^{1,3,4,11}.

1.2 Nanoemulsões: fase, aquosa, fase oleosa, surfactante e superfície

Este tópico visa abordar aspectos relativos às fases que compõem uma nanoemulsão (aquosa e oleosa), bem como as características dos surfactantes e cossurfactantes empregados para a estabilização desse nanossistema. Informações sobre as possibilidades de mudanças na superfície de nanogotículas presentes em uma nanoemulsão também serão comentadas.

1.2.1 Fase aquosa

A fase aquosa utilizada no preparo de uma nanoemulsão também pode conter uma variedade de outros componentes polares, incluindo cos-solventes (tais como álcoois e polióis), carboidratos, proteínas, minerais, ácidos e bases¹². Em emulsões do tipo A/O, é possível incorporar fármacos com afinidade hidrofílica no interior de suas nanogotículas. Essa agregação já foi demonstrada para fármacos direcionados ao tratamento de doenças cerebrovasculares, por vias orais e intranasais, aumentando sua biodistribuição e biodisponibilidade^{13,14}.

Quando utilizada como fase contínua, a fase aquosa torna-se vulnerável a contaminações e desestabilização. Para minimizar tais efeitos, podem ser incorporados agentes conservantes, reguladores de pH e agentes de tonicidade na composição da fase aquosa. É o caso de emulsões parenterais, em que a fase aquosa deve ser isosmótica ao sangue. Isso é obtido com a adição de aditivos, como eletrólitos (cloreto de sódio), glicerol, dextrose e sorbitol. Além disso, a escolha de agentes antimicrobianos é determinante para minimizar a contaminação e contribuir para a manutenção da estabilidade das formulações¹⁵. O pH da nanoemulsão também indica estabilidade e aplicabilidade para as vias parenteral e oftálmica. Emulsões injetáveis devem manter o pH compatível com seu local de aplicação^{16,17}.

1.2.2 Fase oleosa

Diversos óleos (sintéticos e/ou naturais) podem, potencialmente, ser utilizados para compor a fase oleosa de uma nanoemulsão. Antes de selecionar o óleo, é importante conhecer sua composição e seus parâmetros físico-químicos, uma vez que tais características podem influenciar diretamente no tamanho e na estabilidade da nanoemulsão final¹.

Tratando-se de nanoemulsões do tipo O/A, a fase oleosa forma um compartimento de caráter hidrofóbico no interior de cada nanogotícula. Neste contexto, o óleo pode desempenhar um papel importante, como o de acondicionar um fármaco ou composto bioativo no interior do nanossistema. Posteriormente, esse composto pode ser utilizado em aplicações nutricionais, biomédicas ou cosméticas. Dessa forma, a escolha do óleo para compor a nanoemulsão deve levar em consideração a solubilidade do fármaco — que normalmente apresenta características lipofílicas — e a estabilidade do sistema. Normalmente, o óleo que tem potencial máximo de solubilização para o fármaco a ser utilizado é selecionado para compor a fase oleosa do sistema, favorecendo a incorporação da maior concentração possível no interior das nanogotículas¹⁵.

Sabe-se que os triglicerídeos de cadeia longa (TCL) e os triglicerídeos de cadeia média (TCM) têm sido bastante utilizados para fins de formulação. Os TCL são compostos por ácidos graxos com mais de 12 carbonos em sua cadeia alifática e são derivados de fontes vegetais, como óleos de soja, de rícino e de oliva. Os TCM são obtidos pela re-esterificação de ácidos graxos do óleo de coco fracionados (principalmente cáprico e caprílico) com glicerina¹⁸. Os TCM são mais fáceis de nanoemulsificar que os TCL, devido ao seu caráter menos hidrofóbico, em função de suas cadeias alifáticas mais curtas (entre 6 e 12 carbonos)¹. Em contrapartida, a capacidade de dispersão de compostos lipofílicos geralmente aumenta com o comprimento e o grau de saturação da cadeia¹⁹⁻²¹. Dessa forma, a escolha da fase oleosa é frequentemente um equilíbrio entre a sua capacidade de solubilizar o fármaco/composto bioativo e a sua capacidade de favorecer a formação de nanogotículas com as características desejadas^{1,15}. É possível utilizar, ainda, uma mistura de dois ou mais óleos, a fim de obter características de solubilização e emulsificação de interesse¹⁸⁻²⁰. Um exemplo citado na literatura relata a obtenção de nanoemulsões estáveis a partir da mistura de óleo de laranja e TCMs como fase oleosa²¹. Outro exemplo é a incorporação do resveratrol, um composto bioativo natural, em uma nanoemulsão. Após o teste de solubilização em diferentes matrizes de óleos, utilizou-se uma mistura de propilenoglicol e óleo de oliva, a fim de favorecer tanto a solubilidade do composto nas nanogotículas, quanto a estabilização do sistema nanoestruturado²².

Óleos derivados da biodiversidade brasileira também podem ser utilizados como componentes da fase oleosa de nanogotículas. Tais óleos são amplamente estudados por sua composição rica em moléculas bioativas, como agentes antioxidantes e compostos fenólicos²³. Esses componentes, além de importantes para a dieta, possuem atividades biológicas, como o combate e a prevenção de doenças (como o câncer, inflamação), antitrombóticos, antiplaquetários, antibacterianos, cicatrizantes e antimutagênicos²⁴⁻²⁷. A biocompatibilidade desses óleos de origem natural torna esse sistema uma alternativa promissora para a administração de diversos tipos de moléculas bioativas, que já são

parte da composição deles. Nesse contexto, a fase oleosa apresenta tanto um papel estrutural, quanto um papel de atividade bioativa na nanoemulsão. Alguns exemplos são citados a seguir.

Nanoemulsões à base de óleos da biodiversidade brasileira, como óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*), de pequi (*Caryocar brasiliense*), de andiroba (*Carapa guianensis*) e de açaí (*Euterpe oleracea*), foram desenvolvidas com sucesso pelo Laboratório de Compostos Bioativos e Nanobiotecnologia (LCBNano) da Universidade de Brasília²⁸⁻³⁰. As formulações apresentaram nanogotículas esféricas, monodispersas e com diâmetro hidrodinâmico na faixa de 80 nm a 250 nm, dependendo do óleo utilizado. Considerando a riqueza de compostos bioativos presentes nesses óleos (ex.: carotenoides, compostos fenólicos, ácido oleico), estudos desse mesmo laboratório têm avaliado os efeitos de tais nanoemulsões em diferentes aplicações biomédicas. Por exemplo, em ensaios *in vitro*, nanoemulsões à base de óleo de pequi e de buriti reduziram significativamente a viabilidade de células de câncer de mama (MCF-7)^{28,29}. Uma redução similar também foi observada na viabilidade de células de câncer de pele não melanoma (A431), quando expostas a nanoemulsões à base de óleo de andiroba³⁰.

Nanoemulsões à base de óleos derivados da biodiversidade brasileira são versáteis e também permitem a incorporação de fármacos ou outros compostos bioativos de interesse, visando incrementar a atividade deles em uma determinada aplicação. É importante ressaltar, ainda, que a utilização desses óleos para o desenvolvimento de nanoemulsões é promissora e se configura como uma estratégia de agregação de valor à biodiversidade brasileira, contribuindo para a valorização do produto nacional, extrativismo sustentável e preservação das espécies nativas²⁸⁻³⁰.

1.2.3 Surfactante

Como já citado no início deste capítulo, a estabilidade das nanoemulsões é mediada por emulsionantes ou surfactantes. A seleção de um surfactante apropriado (ou combinação de surfactantes) é um dos

fatores mais importantes a serem considerados para o desenvolvimento adequado de uma nanoemulsão. Os surfactantes são moléculas que consistem em uma região de caráter hidrofílica (denominada de “cabeça”) e uma de caráter hidrofóbico (denominada “cauda”). Na maioria dos casos, os grupos não polares são hidrocarbonetos alifáticos, alicíclicos e/ou aromáticos. Por outro lado, os grupos funcionais polares contêm heteroátomos, como oxigênio, nitrogênio e enxofre³¹.

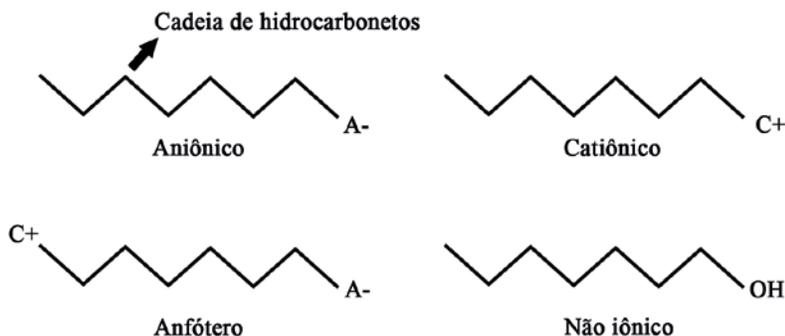
O desempenho funcional dos surfactantes depende das características moleculares de seus grupos de “cabeça” e “cauda”. Eles podem apresentar diferentes estruturas moleculares, porque seus grupos de “cabeça” podem variar em termos de dimensão e carga elétrica, enquanto seus grupos de “cauda” podem variar em número e grau de saturação. A seleção de um determinado surfactante deve levar em conta o tipo de estrutura que precisa ser formada, custo, níveis de uso, compatibilidade de componentes, estabilidade e facilidade de utilização³².

Várias formulações de nanoemulsões empregam normalmente apenas um tipo de surfactante. No entanto, há casos em que uma combinação de surfactantes é necessária para diminuir a tensão interfacial entre água e óleo^{33,34,12}. Pode-se utilizar, ainda, agentes cossurfactantes (por exemplo, etanol e butanol) ou cossolventes (polióis, como propileno glicol, glicerol e sorbitol) para reduzir a tensão interfacial, controlar o tamanho e incrementar a estabilidade das nanogotículas de uma nanoemulsão^{15,12,35-37}.

Os surfactantes (**Figura 2**) podem ser classificados considerando-se seus grupos de funcionalidade polar. A porção hidrofóbica é, frequentemente, uma cadeia de hidrocarbonetos, enquanto a porção polar pode ser iônica (aniônica ou catiônica), anfotérica ou não iônica³⁸.

Figura 2. Diferentes tipos de surfactantes e suas estruturas.

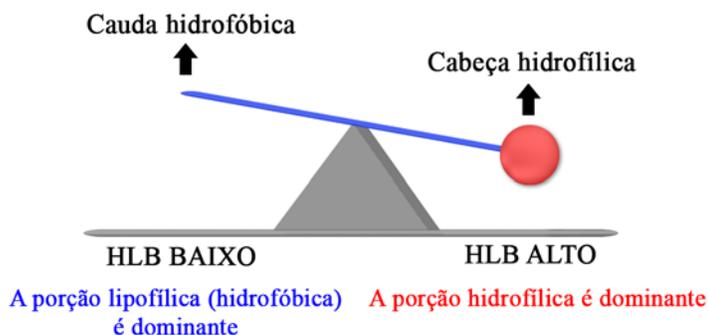
Os surfactantes aniônicos contêm um ânion (A^- , carregado negativamente) em sua cadeia de hidrocarbonetos. Os surfactantes catiônicos contêm um cátion (C^+ , carregado positivamente) em sua cadeia de hidrocarbonetos. Os anfóteros possuem um cátion e um ânion em suas extremidades, diferentemente do não iônico, que possui carga neutra



Fonte: elaborada pelos autores.

Os surfactantes são moléculas interessantes para o preparo de nanoemulsões porque a estrutura e o número de “cabeças” e “caudas” podem ser variados, independentemente. O balanço hidrofílico-lipofílico (HLB)³⁹ é uma característica muito útil para a escolha do surfactante mais adequado à determinada formulação, uma vez que o número e a polaridade das “cabeças” na estrutura do surfactante determinam se ele é solúvel em água ou em óleo. Esse conceito é aplicado pelo cálculo do HLB. Surfactantes com valores elevados de HLB estão associados à facilidade de dispersão em água e são úteis para preparar nanoemulsões de óleo em água. Em contraste, os surfactantes com baixos valores de HLB são úteis para preparar nanoemulsões de água em óleo. Ou seja, quanto maior o HLB, maior a hidrofiliicidade do surfactante, e vice-versa (**Figura 3**).

Figura 3. Representação esquemática do balanço hidrofílico-lipofílico (HLB) de surfactantes



Fonte: elaborada pelos autores.

Em suma, é possível moldar/controlar características, como tamanho e polidispersividade, de uma nanoemulsão, variando-se parâmetros, como valores de HLB do surfactante e a concentração de cossolventes e/ou cossurfactantes empregados. Entre vários surfactantes disponíveis no mercado, as lecitinas, os “poloxamers” e o polissorbato 80 são os mais utilizados na preparação de nanoemulsões⁴⁰. Polietoxilados derivados de óleo de mamona (Cremophor® EL, Cremophor® RH 40 e Cremophor® RH 60) também são utilizados em algumas formulações comercializadas⁴¹. As lecitinas são misturas complexas de fosfolípidos extraídos da gema de ovo ou da soja, cujo componente mais abundante é a fosfatidilcolina⁴². Elas geralmente são utilizadas por apresentarem notável biocompatibilidade; no entanto, dependendo do método empregado para a preparação desse tipo de nanossistema, é necessário acrescentar outro surfactante, a fim de obter nanogotículas estáveis. O polissorbato 80, por exemplo, é bastante utilizado com essa finalidade⁴³.

1.2.4 Modificações na superfície das nanogotículas

A superfície das nanogotículas pode ser modificada, a fim de incrementar sua estabilidade e melhorar sua interação com células/tecidos de interesse. Existem vários tipos de ligantes que podem ser

utilizados para tais modificações. Uma opção é a adição de polímeros de polietilenoglicol (PEG) em sua superfície⁴⁴. O PEG é amplamente empregado como agente emulsificante e solubilizante. Utilizado nas nanoemulsões, age como cossurfactantes, diminuindo o tamanho das gotículas do sistema. Além disso, algumas características da camada de PEG, tais como a sua espessura, densidade de superfície, grupos funcionais e conformação, influenciam na forma como a superfície das nanogotículas interagirá com outras moléculas no organismo⁴⁵.

A adição de polímeros hidrofílicos às nanoemulsões, como polissorbatos 80 ou derivados de PEG, ligados covalentemente à superfície de uma nanogotícula, pode resultar no prolongamento do seu tempo de circulação na corrente sanguínea e melhorar sua biodistribuição⁴⁶⁻⁴⁸. É possível, ainda, adicionar à superfície de nanogotículas outras moléculas, que podem ser especificamente reconhecidas por determinados receptores do organismo, como anticorpos e oligonucleotídeos, para atuarem no direcionamento desses nanossistemas a um tecido-alvo. Por exemplo, Afzal e colaboradores (2016), que adicionaram folato à cadeia de PEG incorporada na superfície de uma nanoemulsão, visando à entrega específica do quimioterápico docetaxel para tratamento antitumoral⁴⁹. Similarmente, Shiokawa e colaboradores (2005) mostraram a modificação da superfície de nanoemulsões com folato em baixas concentrações, para direcioná-las a tumores⁵⁰.

A quitosana também pode ser utilizada como polímero de revestimento de superfícies de nanoemulsões, sendo aminopolissacarídeo linear composto por unidades de D-glucosamina e N-acetil-D-glucosamina unidas por ligações glicosídicas β - (1 \rightarrow 4)⁵¹. Recentemente, esse polímero vem sendo utilizado como objeto de estudo para aplicação em vários campos biomédicos, devido às suas características biofarmacêuticas interessantes, tais como: caráter catiônico, sensibilidade ao pH, biocompatibilidade, biodegradabilidade e baixa toxicidade⁵². De forma geral, a quitosana é insolúvel em meio aquoso e na maioria dos solventes orgânicos. Contudo, pode ser dissolvida em soluções de ácidos fracos, sendo a solução de ácido acético a mais empregada

como solvente⁵². Estudos recentes relatam que a interação celular de nanopartículas de quitosana é normalmente atribuída às interações eletrostáticas, devido ao caráter catiônico da quitosana e às subestruturas da membrana celular, que possuem propriedades aniônicas⁵¹. Severino e colaboradores (2014) utilizaram quitosana como revestimento de nanoemulsões à base de óleos essenciais de tangerina para avaliar atividades antimicrobianas⁵³. Em outro estudo, Sugumar e colaboradores (2015) desenvolveram e caracterizaram nanoemulsões à base de óleo de eucalipto, utilizando diferentes métodos de preparação e incorporando a quitosana nas suas superfícies. Eles validaram a utilização do polímero em estudos de efeitos antimicrobianos dessas nanoemulsões para o tratamento de feridas⁵⁴.

2. Nanoemulsões: métodos de preparação

Para encontrar a composição mais adequada no desenvolvimento de uma nanoemulsão, é crucial investigar em quais valores da razão entre concentração de surfactante/óleo são formadas nanogotículas estáveis e com os diâmetros almejados⁵⁵. Existe uma grande variedade de métodos descritos para se obterem nanoemulsões, como ultrassonicação, emulsificação espontânea, homogeneização a alta pressão, inversão de fases por temperatura (PIT), dentre outros. De modo geral, os processos utilizados podem ser didaticamente classificados em duas grandes classes: (i) de baixa energia e (ii) de alta energia, conforme descrito a seguir.

2.1 Métodos de baixa energia

Nessa categoria de métodos, utilizam-se reagentes cujas concentrações e características químicas permitem produzir nanogotículas por meio de processos mais simples, como o uso de aquecimento e resfriamento, ou até mesmo com uma simples mistura dos componentes da formulação, sem a necessidade de qualquer tipo de agitação mecânica, por exemplo¹¹.

Um dos métodos citados na literatura é o da emulsificação espontânea, que pode ocorrer devido a vários processos físico-químicos⁵⁶, os quais não envolvem adição de energia, seja por meios térmicos, seja por meios mecânicos. Esse processo pode ser facilitado a partir do uso de um solvente orgânico. Komaiko e colaboradores (2015) produziram nanogotículas à base de óleo de canola, peixe, semente de uva (dentre outros), utilizando a técnica de “emulsificação espontânea”⁵⁷.

Outro método de baixa energia amplamente utilizado é o de emulsificação por inversão de fases, que consiste na adição titulométrica da fase aquosa à mistura de fase oleosa com o surfactante (chamada fase orgânica), até que ocorra a inversão de fase com a formação da nanoemulsão. A inversão de fase por temperatura (PIT) é outro exemplo de preparação por método de baixa energia, no qual uma mistura de fase aquosa, fase oleosa e surfactante é aquecida até a temperatura de inversão de fases e rapidamente resfriada com a adição de água gelada (sob agitação constante), resultando na formação de uma nanoemulsão do tipo O/A^{1,3,56}. Ostertag e colaboradores (2012) desenvolveram nanoemulsões à base de óleo de canola, óleo de semente de uva, óleo mineral, óleo de oliva, óleo de laranja e óleo de amendoim a partir da metodologia de PIT, por exemplo⁵⁸.

Os métodos de baixa energia apresentam vantagens, como praticidade e simplicidade de preparo, sem a necessidade de utilização de equipamentos sofisticados para a obtenção das nanogotículas. No entanto, a razão entre as concentrações de surfactante/óleo é, geralmente, maior que 1, nesse tipo de método, ou seja, é empregada no sistema uma maior proporção de surfactante em relação à proporção de óleo, a fim de obter gotículas estáveis e de dimensões nanométricas. Tal característica gera implicações, como o possível aumento no custo final da nanoemulsão, devido à necessidade do uso de mais surfactantes, e também uma possível toxicidade em sistemas biológicos, caso a concentração de surfactantes necessária supere a concentração máxima tolerada pelos organismos^{11,56}.

2.2 Métodos de alta energia

Para se produzir uma nanoemulsão, é necessária uma quantidade de energia livre suficiente para vencer a tensão interfacial entre água-óleo. Uma adaptação da Equação de Gibbs⁵⁸ para a formação de nanoemulsões é apresentada abaixo (**equações 1 e 2**):

$$\Delta G = \Delta H - S\Delta T$$

Equação 1: Equação de Gibbs na forma integral.

$$\Delta G = \Delta(A\gamma) - S\Delta T$$

Equação 2: Equação de Gibbs adaptada para a formação de nanoemulsões.

Na equação ajustada, tem-se A (área interfacial), γ (tensão interfacial), T (temperatura) e S (entropia). Por definição, para que uma nanoemulsão seja formada, é necessário que o termo $\Delta(A\gamma)$ da equação seja menor que o $S\Delta T$. Em outras palavras, a energia interfacial (interação entre as superfícies oleosas e aquosas) não pode ser maior que a própria energia livre do sistema^{56,58}. Dessa forma, mais energia livre precisa ser utilizada no sistema para favorecer a formação das nanogotículas. Nos métodos de baixa energia, a energia livre advém de processos físico-químicos envolvidos nas etapas de produção. Em contrapartida, nos métodos de alta energia, a energia livre advém de forças mecânicas aplicadas no sistema (turbulência, cisalhamento, cavitação). Portanto, os métodos dessa categoria envolvem o uso de equipamentos como sonicadores, homogeneizadores de alta pressão e outros equipamentos, todos capazes de romper mecanicamente as gotículas da fase dispersa, conferindo-lhes dimensões nanométricas⁵⁶. Dentre os principais métodos de alta energia, destacam-se a homogeneização à alta pressão, a microfluidização e a ultrassonicação.

2.2.1 Homogeneização à alta pressão (HAP)

No processo de HAP, a mistura dos componentes de uma nanoemulsão (fase aquosa, oleosa e surfactante) é forçada contra uma cavidade (chamada “agulha”), gerando alta tensão na estrutura do fluido,

juntamente com cavitação, resultando na dispersão das partículas. Esse método tem a capacidade de gerar partículas de tamanhos próximos a 1 nm — dependendo das configurações do equipamento — em razão das forças hidráulicas, da turbulência intensiva e da cavitação, que agem em conjunto. Esse método pode ser utilizado tanto em escala laboratorial, quanto em industrial^{58,59}.

A desvantagem da técnica é o alto consumo de energia, aumento da temperatura da nanoemulsão durante o processo e a dificuldade de se gerarem nanoemulsões em fluidos com viscosidade elevada^{58,59}. Yuan e colaboradores (2008) sintetizaram nanoemulsões do tipo (O/A) por esse método utilizando β -caroteno como componente da fase oleosa, e obtiveram resultados satisfatórios quanto à estabilidade físico-química das nanogotículas obtidas. No entanto, os dados referentes à estabilidade química não foram satisfatórios, considerando que a molécula de β -caroteno foi suscetível à degradação durante longos períodos de armazenamento⁶⁰. Qian e McClements (2011) estudaram os fatores que afetam o tamanho das partículas nessa metodologia com nanoemulsões à base de óleo de milho e concluíram que o tamanho das nanoemulsões pode ser controlado pelo número de passagens pelo equipamento de homogeneização e da pressão estabelecida⁶¹.

2.2.2 Microfluidização

A técnica de microfluidização consiste em forçar a passagem da mistura dos componentes de uma nanoemulsão por uma câmara constituída por um sistema de microcanais sob alta pressão. Nesse processo, a eficiência da formação das nanogotículas é determinada pelo tempo de processamento, formato da câmara de microcanais e pressão utilizada¹.

Com isso, é possível determinar, com precisão, o tamanho das nanogotículas e sua distribuição. Esse método pode ser usado tanto em escala laboratorial, quanto em escala industrial. Schuh e colaboradores (2018) produziram com sucesso nanoemulsões catiônicas com índice de polidispersão inferior a 0,25 e diâmetro hidrodinâmico na faixa de

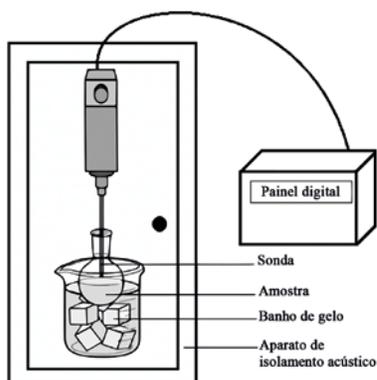
(100-200) nm, utilizando esse método⁶². Adicionalmente, García-Márquez e colaboradores (2017) foram capazes de sintetizar nanogotículas à base de óleo de peixe com diâmetro hidrodinâmico de 155 nm e índice de polidispersão de 0,15 a partir dessa metodologia⁶³.

2.2.3 Ultrassonicação

A ultrassonicação é um método de alta energia, que faz uso de um equipamento denominado sonicador, o qual emite ondas sonoras com energia suficiente para interagir com o sistema e diminuir o tamanho das gotículas das nanoemulsões. A **Figura 4** apresenta uma representação esquemática de um sistema de sonicação.

A intensidade da sonicação, juntamente com o tempo de processamento, é um parâmetro crucial que influencia o diâmetro e o índice de polidispersão das nanogotículas⁶⁴. Em geral, quanto maior a intensidade de sonicação, menor o diâmetro das nanogotículas.

Figura 4. Representação esquemática de um sistema de sonicação, com o banho de gelo (para evitar o demasiado aquecimento da amostra) e aparato de isolamento acústico



Fonte: elaborada pelos autores.

A sonicação é uma metodologia de obtenção de nanoemulsões por alta energia bem estabelecida em escala laboratorial. Porém, as suas

condições de operação podem ser inadequadas para fármacos lábeis e macromoléculas, pois acabam por aquecer as amostras, podendo desestabilizá-las. Para tanto, faz-se o uso do banho de gelo, que reduz os efeitos do aquecimento⁶⁵. Walia e colaboradores (2017) encapsularam vitamina D em nanoemulsões à base de óleo de peixe produzidas por ultrassonicação e concluíram que esse método é adequado para a produção de tais sistemas⁶⁵. Ao passo que Shamsara e colaboradores (2015) estudaram os efeitos da ultrassonicação na estabilidade de nanoemulsões de lactoglobulina. Seus resultados apontam que o tempo de sonicação, juntamente com a amplitude, produz um impacto direto na diminuição do tamanho de partícula e no potencial zeta⁶⁶.

De modo geral, os métodos de alta energia costumam apresentar excelentes resultados em relação à estabilidade e aos parâmetros físicos das nanoemulsões (diâmetros e índices de polidispersão menores), mesmo empregando uma razão entre as concentrações de surfactante/óleo geralmente menores que 1⁵⁶. Algumas limitações consistem no aquecimento das amostras devido à liberação da energia na forma de calor e ao custo de manutenção e de operação dos equipamentos a longo prazo¹².

3. Estabilidade de nanoemulsões

A verificação da estabilidade de nanoemulsões é fundamental desde seu processo de obtenção, armazenamento até aplicação. Vários parâmetros podem ser utilizados para avaliar tal estabilidade, como aspecto macroscópico, o diâmetro hidrodinâmico, índice de polidispersão, potencial zeta, pH, oxidação, dentre outros.

A aparência (aspecto macroscópico) de uma nanoemulsão pode ser caracterizada considerando-se a homogeneidade, a opacidade e a cor^{3,56,67}. Uma nanoemulsão estável apresenta aspecto visual homogêneo porque as nanogotículas estão uniformemente distribuídas no sistema. Adicionalmente, quanto menor for o tamanho das nanogotículas, menos opaca será a nanoemulsão^{3,56}.

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão (PDI) são parâmetros importantes de serem monitorados ao longo do tempo. O diâmetro hidrodinâmico refere-se ao diâmetro da nanogotícula, considerando-se a camada de solvatação da água em torno dela^{3,56}. Já o PDI é uma medida dada no intervalo de 0 a 1, que fornece informações referentes à homogeneidade da distribuição dos diâmetros das nanogotículas, ou seja, um PDI próximo de 1 indica que o sistema consiste em nanogotículas de tamanhos muito diferentes entre si^{3,56,64}.

O potencial zeta de uma nanopartícula está relacionado às cargas presentes na sua superfície. Essa medida é diretamente influenciada pela composição e pelo pH da nanoemulsão⁵⁷. A longo prazo, alterações nesse parâmetro podem indicar mudanças de pH da nanoemulsão, o que caracteriza um sinal de instabilidade. A determinação do potencial zeta também pode ser utilizada para estimar a estabilidade de uma formulação por meio da probabilidade de interação eletrostática entre as nanogotículas. Tal estimativa é baseada na teoria de atração e repulsão de cargas¹² e estabelece que o módulo do potencial zeta é diretamente proporcional à repulsão eletrostática entre as nanogotículas; consequentemente, a repulsão entre nanogotículas minimiza a coalescência

(ver definição abaixo) entre elas e é um indicativo de estabilidade do sistema¹². É importante ressaltar que nanoemulsões com valores de potencial zeta próximos de zero também podem ser consideradas sistemas estáveis, caso a coalescência entre as nanogotículas esteja sendo minimizada por moléculas presentes nas suas superfícies, que atuam promovendo um impedimento estérico e reduzindo as chances de aproximação entre elas⁶⁸⁻⁷¹.

Nanoemulsões são suscetíveis a processos de desestabilização (separação de fases, por exemplo), uma vez que não apresentam estabilidade termodinâmica^{72,73}. Tais processos ocorrem naturalmente em fluidos constituídos por compostos de densidade muito diferentes entre si, e são conhecidos como coalescência, maturação de Ostwald e floculação.

3.1 Coalescência

Neste processo, as nanogotículas do sistema se unem, formando uma gotícula única e maior, causando a diminuição da área de contato entre as fases contínua e dispersa, podendo acarretar, então, a separação total de fases. Durante o processo, a área interfacial diminui e, como consequência, o mesmo acontece com a energia livre do sistema⁷¹. Há razões para acreditar que as nanoemulsões são menos sujeitas à coalescência após a emulsificação, em comparação com as partículas de diâmetros da ordem de micrômetros, uma vez que o tamanho reduzido das nanogotículas previne a deformação destas e, conseqüentemente, a coalescência^{64,75}.

3.2. Maturação de Ostwald

Este efeito ocorre, principalmente, em nanoemulsões com dispersão de diâmetros heterogênea (PDI próximo de 1), em que nanogotículas menores são incorporadas por gotículas maiores, levando à formação de uma única gota ou separação de fases. Isso ocorre, pois há diferenças entre a solubilidade de gotículas de tamanhos diferentes, o que favorece a condensação delas^{64,76}.

3.3 Floculação

O evento da floculação é caracterizado pela aproximação e união de nanogotículas sem coalescerem, ou seja, mantendo a integridade individual de cada uma quando em repouso³. A presença e as propriedades dos flocos podem ser medidas ao longo do tempo ou após a nanoemulsão ser exposta a condições ambientais particulares (como variações no pH, força iônica ou temperatura). A formação de flocos em uma nanoemulsão pode ser determinada diretamente ou indiretamente, usando uma variedade de métodos analíticos, incluindo microscopia, reologia e métodos de estabilidade gravitacional⁶⁷.

3.4 Oxidação

Nanoemulsões são sistemas compostos essencialmente por matrizes lipídicas. Sabe-se que alguns compostos de carbono sofrem mudanças estruturais com barreiras energéticas, que podem ser alcançadas até mesmo em temperatura ambiente⁷⁷. Tais mudanças incluem a oxidação foto/termoquímica e autoisomerização. Oxidação é um conjunto de reações químicas que ocorrem entre um agente oxidante e um agente redutor. De forma mais simples, diz-se que o agente oxidante é reduzido (ganha elétrons), ao passo que o agente redutor é oxidado, perdendo elétrons. Em situações considerando cadeias de átomos de carbono, uma oxidação pode alterar a estereoquímica e a isomeria dos átomos ao criar ligações duplas, triplas ou mudar a posição dos ligantes de Z (*cis*) para E (*trans*)⁷⁸.

Todo lipídio pode sofrer oxidação se exposto à luz ou a variações muito altas de temperatura. Portanto, infere-se que, similarmente, a fase oleosa de nanoemulsões pode se tornar instável e sofrer inúmeras reações de degradação na presença de calor, luz, metais, umidade e oxigênio^{79,80}. O monitoramento da oxidação lipídica, também denominada de peroxidação lipídica, em nanoemulsões, ao longo do tempo, é um parâmetro pouco relatado na literatura, porém representa um aspecto determinante na estabilidade desse tipo de nanossistema. Silva (2017) e Silva (2018) estudaram a estabilidade de nanoemulsões à base de óleo de pequi e óleo de buriti a longo prazo e mostraram que,

mesmo que alterações nos parâmetros de diâmetro hidrodinâmico e PDI não fossem detectadas, a peroxidação lipídica estava ocorrendo, especialmente quando as nanoemulsões eram armazenadas expostas à luz e a temperaturas próximas de 37°C^{79,81}. Ou seja, nesse caso, o monitoramento apenas do diâmetro hidrodinâmico e do PDI não foi suficiente para confirmar que aquelas amostras de nanoemulsões eram estáveis. Diante disso, o conhecimento da estabilidade oxidativa de uma nanoemulsão é uma informação necessária para se determinar a melhor forma de armazenamento e seu prazo de validade em relação às aplicações nutricionais, biomédicas ou cosméticas.

Métodos espectrofotométricos e cromatográficos podem ser empregados para o monitoramento da peroxidação lipídica. Em geral, métodos colorimétricos são mais utilizados, por apresentarem reprodutibilidade e baixo custo⁸². É importante ressaltar que, muitas vezes, esses métodos clássicos precisam ser adaptados antes de serem utilizados na determinação de peroxidação lipídica de nanoemulsões. Por exemplo, para monitorar a peroxidação lipídica em nanoemulsões à base de óleo de pequi, Silva (2017)⁷⁹ precisou padronizar e estabelecer um protocolo colorimétrico adaptado para nanoemulsões, baseando-se no protocolo clássico de detecção de peroxidação lipídica de Shantha e Decker (1994)⁸³.

De modo geral, as estratégias que visam controlar a estabilidade das nanoemulsões incluem alterações em parâmetros como temperatura de armazenamento, força iônica da fase aquosa, solubilidade e composição dos reagentes da formulação e a concentração de surfactantes e cossurfactantes³. Recomenda-se sempre buscar monitorar a estabilidade das nanoemulsões produzidas, uma vez que tal avaliação impacta diretamente o armazenamento, a comercialização e a garantia de eficácia desses nanossistemas no momento de sua aplicação.

4. Conclusão

Neste capítulo, foram apresentados e discutidos aspectos sobre as características das nanoemulsões e seus componentes, algumas metodologias de preparação e parâmetros de avaliação de estabilidade. A partir dessas informações, pode-se concluir que a nanoemulsão é uma plataforma nanoestruturada robusta, cineticamente estável, produzida por metodologias relativamente simples e versáteis em relação à gama de possibilidades de variações que podem ser feitas na sua composição, visando ajustá-la para uma determinada aplicação de interesse. Mais estudos relacionados à preparação e à estabilidade das nanoemulsões ainda estão em andamento; no entanto, as informações disponíveis até o presente momento já evidenciam suas potencialidades e as colocam no rol de plataformas inovadoras para serem utilizadas em aplicações nutricionais, biomédicas e cosméticas.

5. Referências

1. NASEEMA, A. et al. A critical review of synthesis procedures, applications and future potential of nanoemulsions. **Adv Colloid Interface Sci.** v. 287, p. 102318, 2020.
2. PEER, Dan et al. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. **Nature Nanotechnology**, v. 2, n. 12, p.751-760, 2007.
3. GUPTA, Ankur et al. Nanoemulsions: formation, properties and applications. **Soft Matter**, v. 12, n. 11, p.2826-2841, mar. 2016.
4. FIGUEIRAS, A. R. R; COIMBRA, A. B; VEIGA, F. J. B. Nanotecnologia na saúde: aplicações e perspectivas. **Boletim Informativo Geum**, v. 5, n. 2, p.14-26, abr./jun. 2014.
5. SEKHON, Bhupinder Singh. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, p.31-53, 2014.
6. PRADHAN, Neha et al. Facets of nanotechnology as seen in food processing, packaging, and preservation industry. **BioMed Research International**, v. 2015, Article ID 365672, 17 pages, 2015.
7. PIKTEL, Ewelina et al. Recent insights in nanotechnology-based drugs and formulations designed for effective anti-cancer therapy. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p.39, mai. 2016.
8. NG, Terence et al. The genetic variants underlying breast cancer treatment-induced chronic and late toxicities: a systematic review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 40, n. 10, p.1199-1214, 2014.
9. THAKUR, Ajay; WALIA, Manpreet Kaur; KUMAR, S. Nanoemulsion in enhancement of bioavailability of poorly soluble drugs: a review. **Pharmacophore**, v. 4, n. 1, p. 15-25, 2013.

10. MINKO, Tamara; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, Lorna; POZHAROV, Vitaly. Nanotechnology approaches for personalized treatment of multidrug resistant cancers. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 13-14, p.1880-1895, 2013.
11. SINGH, Yuvraj et al. Nanoemulsion: Concepts, development and applications in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 252, p.28-49, abr. 2017.
12. MCCLEMENTS, David Julian; RAO, Jiajia. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication, properties, performance, biological fate, and potential toxicity. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, n. 4, p.285-330, 2011.
13. DING, Zhiying et al. W/O nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of Panax notoginseng saponins for brain targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p.e11, 2015.
14. MAHAJAN, Hitendra S. et al. Nanoemulsion-based intranasal drug delivery system of saquinavir mesylate for brain targeting. **Drug Delivery**, v. 21, n. 2, p.148-154, 2014.
15. DATE, Abhijit A.; NAGARSENKER, M. S. Parenteral microemulsions: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 355, n. 1-2, p.19-30, 2008.
16. AMMAR, Hussein O. et al. Nanoemulsion as a potential ophthalmic delivery system for dorzolamide hydrochloride. **Aaps Pharm-scitech**, v. 10, n. 3, p.808, 2009.
17. DRISCOLL, David F. Lipid injectable emulsions: 2006. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 21, n. 4, p.381-386, 2006.
18. BENITA, S; LEVY, M. Y. Submicron emulsions as colloidal drug carriers for intravenous administration: comprehensive physicochemical characterization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 82, n. 11, p.1069-1079, 1993.
19. VANDAMME, Th F. Microemulsions as ocular drug delivery systems: recent developments and future challenges. **Progress in Retinal and Eye Research**, v. 21, n. 1, p.15-34, 2002.

20. LU, Yan; WANG, YanJiao; TANG, Xing. Formulation and thermal sterile stability of a less painful intravenous clarithromycin emulsion containing vitamin E. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 346, n. 1-2, p.47-56, 2008.
21. CHANG, Yuhua; MCCLEMENTS, David Julian. Optimization of orange oil nanoemulsion formation by isothermal low-energy methods: influence of the oil phase, surfactant, and temperature. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 10, p.2306-2312, mar. 2014.
22. HERNEISEY, Michele et al. Development and characterization of resveratrol nanoemulsions carrying dual-imaging agents. **Therapeutic Delivery**, v. 7, n. 12, p.795-808, dez. 2016.
23. REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for cancer prevention: a global perspective. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 99, n. 1, p.1-13, 2003.
24. MARTINS, Renata C.; FILGUEIRAS, Tarciso S.; ULYSSES, P. Ethnobotany of *Mauritia flexuosa* (Arecaceae) in a maroon community in central Brazil. **Economic Botany**, v. 66, n. 1, p.91-98, 2012.
25. SILVESTRI, Jandimara Donielli Fior et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p.589-594, out. 2010.
26. BATISTA, J. S. et al. Avaliação da atividade cicatrizante do óleo de pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm) em feridas cutâneas produzidas experimentalmente em ratos. **Arquivo do Instituto Biológico**, v. 77, n. 3, p.441-447, 2010.
27. MARTIN-MORENO, Jose M. et al. Dietary fat, olive oil intake and breast cancer risk. **International Journal of Cancer**, v. 58, n. 6, p.774-780, 1994.
28. SAMPAIO, Marina C. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama *in vitro***. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

29. OMBREDANE, Alicia S. et al. Nanoemulsion-based systems as a promising approach for enhancing the antitumoral activity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess.) in breast cancer cells. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 58, p. 101819, 2020.
30. SILVA, Lucas C. **Análise da estabilidade oxidativa e efeitos antitumorais de nanoemulsões à base de óleos derivados da biodiversidade brasileira associadas ao resveratrol em células de câncer de pele não melanoma**. 2020. 88f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2020.
31. CARPINÉ, Danielle. **Desenvolvimento e caracterização de filme emulsionado biodegradável produzido a partir de proteína isolada de soja, óleo de coco e surfactantes naturais**. 2015. Tese de Doutorado (Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos). UFPR, Paraná, 2015.
32. MCCLEMENTS, David Julian. Structural design principles for improved food performance: nanolaminated biopolymer structures in foods. **Micro/Nanoencapsulation of Active Food Ingredients**, v. 1007, p.3-34, 2009.
33. LIU, G. Y.; WANG, J. M.; XIA, Q. Application of nanostructured lipid carrier in food for the improved bioavailability. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 3, p.391-398, 2012.
34. ZHENG, Kai et al. The effect of polymer–surfactant emulsifying agent on the formation and stability of α -lipoic acid loaded nanostructured lipid carriers (NLC). **Food Hydrocolloids**, v. 32, n. 1, p.72-78, 2013.
35. YAGHMUR, Anan; ASERIN, Abraham; GARTI, Nissim. Phase behavior of microemulsions based on food-grade nonionic surfactants: effect of polyols and short-chain alcohols. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 209, n. 1, p.71-81, 2002.
36. FLANAGAN, John; SINGH, Harjinder. Microemulsions: a potential delivery system for bioactives in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 46, n. 3, p.221-237, 2006.

37. OZAWA, Kazuyo; OLSSON, Ulf; KUNIEDA, Hironobu. Oil-induced structural change in nonionic microemulsions. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 22, n. 1, p.119-124, 2001.
38. DESAI, Jitendra D.; BANAT, Ibrahim M. Microbial production of surfactants and their commercial potential. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 61, n. 1, p.47-64, 1997.
39. HASENHUETTL, Gerard L. et al. (Ed.). **Food Emulsifiers and Their Applications**. New York: Springer, 2008.
40. STRICKLEY, Robert G. Solubilizing excipients in oral and injectable formulations. **Pharmaceutical Research**, v. 21, n. 2, p.201-230, 2004.
41. AKERS, Michael J. Excipient–drug interactions in parenteral formulations. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 11, p.2283-2300, 2002.
42. FRONZA, Tassiana; CAMPOS, Ângela; TEIXEIRA, Helder. Nanoemulsões como sistemas de liberação para fármacos oftálmicos. **Acta Farm Bonaerense**, v. 23, n. 4, p.558-556, 2004.
43. MORENO, Marco Antonio; BALLESTEROS, M. Paloma; FRUTOS, Paloma. Lecithin-based oil-in-water microemulsions for parenteral use: pseudoternary phase diagrams, characterization and toxicity studies. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 92, n. 7, p.1428-1437, 2003.
44. RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Carotenes and xanthophylls as antioxidants. In: SHAHIDI, Fereidoon. **Handbook of Antioxidants for Food Preservation**. 1 ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2015. Cap. 2, p.17-50.
45. COWENS III, D.E.; PEPPAS, N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, vol. 21, p.93-102, 2005.

46. WANG, Junping; MAITANI, Yoshie; TAKAYAMA, Kozo. Antitumor effects and pharmacokinetics of aclacinomycin A carried by injectable emulsions composed of vitamin E, cholesterol, and PEG-lipid. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, n. 4, p.1128-1134, 2002.
47. LIU, Feng; LIU, Dexi. Long-circulating emulsions (oil-in-water) as carriers for lipophilic drugs. **Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 7, p.1060-1064, 1995.
48. TORCHILIN, Vladimir P. et al. Poly (ethylene glycol) on the liposome surface: on the mechanism of polymer-coated liposome longevity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1195, n. 1, p.11-20, 1994.
49. AFZAL, Syed Muzammil et al. Folate-PEG-decorated docetaxel lipid nanoemulsion for improved antitumor activity. **Nanomedicine**, v. 11, n. 16, p.2171-2184, 2016.
50. SHIOKAWA, Tomonori et al. Effect of polyethylene glycol linker chain length of folate-linked microemulsions loading aclacinomycin A on targeting ability and antitumor effect in vitro and in vivo. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 5, p.2018-2025, 2005.
51. DOH, K.; YEO, Y. Application of polysaccharides for surface modification of nanomedicines. **Therapeutic Delivery**, v. 3, n. 12, p.1447-1456, 2012.
52. LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, VT de. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. **Química nova**, v. 32, n. 3, p.672-678, 2009.
53. SEVERINO, Renato et al. Antibacterial and physical effects of modified chitosan based-coating containing nanoemulsion of mandarin essential oil and three non-thermal treatments against *Listeria innocua* in green beans. **International Journal of Food Microbiology**, v. 191, p.82-88, 2014.

54. SUGUMAR, Saranya; MUKHERJEE, Amitava; CHANDRASEKARAN, Natarajan. Eucalyptus oil nanoemulsion-impregnated chitosan film: antibacterial effects against a clinical pathogen, *Staphylococcus aureus*, *in vitro*. **International Journal of Nano-medicine**, v. 10, n. Suppl 1, p.67-75, out. 2015.
55. MATSARIDOU, Irini et al. The influence of surfactant HLB and oil/surfactant ratio on the formation and properties of self-emulsifying pellets and microemulsion reconstitution. **AAPS PharmSci-Tech**, v. 13, n. 4, p.1319-1330, 2012.
56. KOMAIKO, Jennifer S.; MCCLEMENTS, David Julian. Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 2, p.331-352, 2016.
57. KOMAIKO, Jennifer; MCCLEMENTS, David Julian. Low-energy formation of edible nanoemulsions by spontaneous emulsification: Factors influencing particle size. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p.122-128, 2015.
58. OSTERTAG, Felix; WEISS, Jochen; MCCLEMENTS, David Julian. Low-energy formation of edible nanoemulsions: factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 388, n. 1, p.95-102, 2012.
59. BILBAO-SÁINZ, Cristina et al. Nanoemulsions prepared by a low-energy emulsification method applied to edible films. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 22, p.11932-11938, 2010.
60. YUAN, Yuan et al. Characterization and stability evaluation of β -carotene nanoemulsions prepared by high pressure homogenization under various emulsifying conditions. **Food Research International**, v. 41, n. 1, p.61-68, 2008.
61. QIAN, Cheng; MCCLEMENTS, David Julian. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: factors affecting particle size. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p.1000-1008, 2011.

62. SCHUH, Roselena S. et al. Physicochemical properties of cationic nanoemulsions and liposomes obtained by microfluidization complexed with a single plasmid or along with an oligonucleotide: implications for CRISPR/Cas technology. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 530, p.243-255, nov. 2018.
63. GARCÍA-MÁRQUEZ, E.; HIGUERA-CIAPARA, I.; ESPINOSA-ANDREWS, H. Design of fish oil-in-water nanoemulsion by microfluidization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 40, p.87-91, abr. 2017.
64. BEDIN, Alessander Carlos et al. **Nanoemulsões contendo Benzimidazol: desenvolvimento, caracterização e estudo de liberação *in vitro***. 2011. 110f. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmacologia) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2011.
65. WALIA, Niharika et al. Fish oil-based Vitamin D nanoencapsulation by ultrasonication and bioaccessibility analysis in simulated gastro-intestinal tract. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 39, p.623-635, nov. 2017.
66. SHAMSARA, Omid et al. Effect of ultrasonication, pH and heating on stability of apricot gum–lactoglobuline two-layer nanoemulsions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81, p.1019-1025, nov. 2015.
67. MCCLEMENTS, Jake; MCCLEMENTS, David Julian. Standardization of nanoparticle characterization: methods for testing properties, stability, and functionality of edible nanoparticles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 8, p.1334-1362, jun. 2016.
68. ADJONU, Randy et al. Whey protein peptides as components of nanoemulsions: A review of emulsifying and biological functionalities. **Journal of Food Engineering**, v. 122, p.15-27, fev. 2014.
69. BERNARDI, Daniela S. et al. Formation and stability of oil-in-water nanoemulsions containing rice bran oil: *in vitro* and *in vivo* assessments. **Journal of nanobiotechnology**, v. 9, n. 1, p.44, set. 2011.

70. IZQUIERDO, P. et al. Formation and stability of nano-emulsions prepared using the phase inversion temperature method. **Langmuir**, v. 18, n. 1, p.26-30, 2002.
71. MCCLEMENTS, David Julian. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. **Soft matter**, v. 8, n. 6, p.1719-1729, dez. 2012.
72. SHAMS, Najmeh; SAHARI, Mohammad Ali. Nanoemulsions: preparation, structure, functional properties and their antimicrobial effects. **Applied Food Biotechnology**, v. 3, n. 3, p.138-149, 2016.
73. RAHN-CHIQUE, Kareem et al. Nanoemulsion stability: experimental evaluation of the flocculation rate from turbidity measurements. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 178, p.1-20, out. 2012.
74. BECHER, P. **Encyclopedia of Emulsion Technology**, 1 ed. New York: Marcel Dekker Inc., 1983. 725 p.
75. TADROS, Tharwat et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108, p.303-318, 2004.
76. WOOSTER, Tim J.; GOLDING, Matt; SANGUANSRI, Peerasak. Impact of oil type on nanoemulsion formation and Ostwald ripening stability. **Langmuir**, v. 24, n. 22, p.12758-12765, 2008.
77. CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic chemistry**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2012. Cap. 16, p. 360-363.
78. CLAYDEN, Jonathan; GREEVES, Nick; WARREN, Stuart. **Organic chemistry**. 2 ed. Oxford: Oxford University Press, 2012. Cap. 19, p. 429-433.
79. SILVA, Lucas C. et al. **Monitoramento e avaliação da oxidação e atividade antioxidante de nanoemulsões à base de óleos naturais**. 2017. 44f. Trabalho de conclusão de curso TCC (Graduação em Farmácia), Universidade de Brasília, 2017.

80. GUIMARÃES, Luiz Gustavo de L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p.1476-1480, 2008.
81. SILVA, Leonardo O. B. et al. Avaliação do processo de oxidação em nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*). In: 24º Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília, 2018, Brasília. **Anais do 24º Congresso de Iniciação Científica da Universidade de Brasília**. Brasília: UnB, 2018.
82. SILVA, Francisco; BORGES, M. Fernanda.; FERREIRA, Margarida. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p.94-103, 1999.
83. SHANTHA, NALUR C.; DECKER, Eruc A. Rapid, sensitive, iron-based spectrophotometric methods for determination of peroxide values of food lipids. **Journal of AOAC International**, v. 77, n. 2, p.421-424, 1994.

CAPÍTULO 3

Lipossomas e suas aplicações

Jaqueline R. Da Silva^{1*}; Jaqueline V. Oliveira²; Victor Hugo S Araujo²

1. Introdução

Desde que foi descrito pela primeira vez pelo hematologista inglês Alec Banghan¹, em 1965, o lipossoma tem sido desenvolvido como um potencial sistema para carregamento de fármacos, e tornando-se parte integrante de pesquisas e aplicações clínicas no campo da nanomedicina². Devido ao amplo desenvolvimento de matérias e tecnologia na preparação de lipossomas, vários fármacos, biomoléculas e genes que apresentavam implicações para uso clínico por problemas de estabilidade, solubilidade e toxicidade podem ter seus índices terapêuticos melhorados, principalmente, por meio de alterações na sua farmacocinética e farmacodinâmica³.

A formação termodinamicamente estável, e a possibilidade de incorporar moléculas hidrofílicas e lipofílicas simultaneamente ou não, conferiu aos lipossomas vantagens que viabilizaram a formulação de diversos fármacos que hoje estão disponíveis para uso humano e em muitos produtos que estão sujeitos a ensaios clínicos^{4,5}. Dentre as vantagens

1. Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasil - E-mail: sol.jaque@gmail.com

2. Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia - Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasil.

do uso de lipossomas, incluem-se: melhora da solubilidade dos fármacos encapsulados; prevenção da degradação química e biológica; melhora da eficácia e índices terapêuticos por meio da redução da toxicidade e de efeitos secundários não específicos dos medicamentos encapsulados; possibilidade de direcionamento específico e eficiência de entrega aos locais de ação pretendidos pela conjugação a ligantes de superfície específicos; e, compatibilidade com materiais biodegradáveis e não tóxicos⁶⁻⁸.

Estruturas em escala nanométrica estão presentes na nossa alimentação cotidiana; proteínas, polissacarídeos e lipídeos são exemplos de polímeros que estão em escala nanométrica⁹. A nanotecnologia vem sendo utilizada na indústria de alimentos com o intuito de aprimorar características organolépticas, aperfeiçoar processos para o desenvolvimento de produtos, no aumento do valor nutricional, inibição da degradação de produtos e consequente melhoria no tempo de meia-vida destes, como também na detecção de patógenos e substâncias tóxicas¹⁰. A utilização de lipossomas na indústria de alimentos é uma atividade emergente e se baseia em suas propriedades já relatadas em estudos de desenvolvimento, caracterização e aplicação biomédica, como estabilidade cinética, baixo custo para desenvolvimento e alta biocompatibilidade¹¹.

2. Composição Lipídica e Formação dos Lipossomas

Moléculas anfipáticas (fosfolipídios, colesterol e glicolipídios) são usadas na preparação de lipossomas, tendo como modelo a estrutura das membranas biológicas. Na **tabela 1**, temos uma lista dos principais fosfolipídios e suas temperaturas de transição de fase (T_c), amplamente revisada e discutida por Szoka & Papahadiopoulos⁶; e Walde & Ichikawa¹². Além desses, o colesterol é utilizado para reduzir a permeabilidade da bicamada para íons e pequenas moléculas polares tornando-a mais rígida.

Tabela 1 – Fosfolipídios usados nas preparações de lipossomas e suas respectivas temperaturas de transição de fase (Tc)

Fosfolipídio	Abreviação	Tc (°C)
Fosfatidilcolina de Ovo	EPC	-15 a -7
Fosfatidilcolina de Soja	PCSoja	-15 a -5
1,2-dilauril-sn-glicero-3-fosfatidilcolina	DLPC (C12:0)	-1,8
1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina	DMPC (C14:0)	23
1,2-dipalmitoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina	DPPC (C16:0)	41
1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina	DSPC (C18:0)	55
1-miristoil-2-palmitoilfosfatidilcolina	MPPC (C14:0,16:0)	27
1-Palmitoil-2-miristoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina	PMPC (C16:0,14:0)	35
1 -Palmitoil-2-estearoil fosfatidilcolina	PSPC (C16:0,18:0)	44
1-Estearoil-2-palmitoil fosfatidilcolina	SPPC (C18:0,16:0)	47
1,2-Dioleoil-sn-glicero-3-fosfoglicerol	DOPC (C18:1)	-22
1,2-Dilauril-sn-glicero-3-fosforilglicerol	DLPG	4
1,2-Dimiristoil-sn-glicero-3- fosforilglicerol	DMPG	23
1,2-Dipalmitoilfosfatidilglicerol	DPPG	41
1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glycerol)	DSPG	55
Dioleoilfosfatidilglicerol	DOPG	-18
Dimiristoil ácido fosfatídico	DMPA	51
Dipalmitoil ácido fosfatídico	DPPA	67
Dimiristoil fosfatidiletanol	DMPE	50
Dipalmitoil fosfatidiletanol	DPPE	60
Dimiristoil fosfatidilserine	DMPS	38
Dipalmitoil fosfatidilserine	DPPS	51
Distearoil esfingomielina	DSSP	57
Dipalmitoil esfingomielina	DPSP	41
Palmitoiloleoilfosfatidilcolina	POPC	-2,5
1-estearoil-2-oleoil-sn-glicero-3-fosfatidilcolina;	SOPC	6,9

Fontes: Szoka & Papahadiopoulos (1980)⁴; e Walde & Ichikawa (2001)¹².

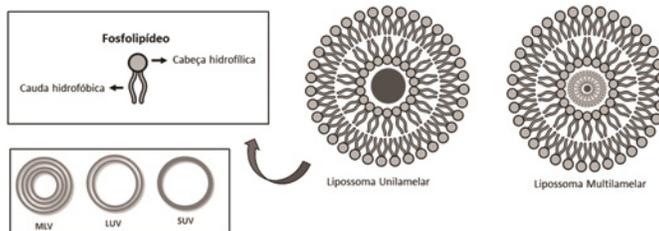
Como descrito e revisado por Ulrich¹³ e Patil & Jadhav¹⁴, a formação dos lipossomas é devido ao caráter anfipático dos fosfolipídios que formam a bicamada, por meio de um processo de automontagem, que envolve a energia da borda da bicamada lipídica, associada à cadeia

hidrofóbica do fosfolípido quando exposta à água (energia de flexão); e a cinética do dobramento da bicamada devido às forças hidrodinâmicas do sistema (durante a hidratação) (**Figura 1**). A escolha do lipídio e a concentração em quantidade de matéria de cada um dos componentes na formação do lipossoma podem promover alterações como: separação de fases, assimetria, não formação da estrutura de bicamada e mudanças na composição da superfície externa; levando ao desenvolvimento de vesículas instáveis. A estabilidade física dessas estruturas é determinada pelo comportamento coloidal e sua capacidade em manter por longos períodos de estocagem o material encapsulado em sua estrutura.

3. Classificação e Métodos de Preparação dos Lipossomas

Os lipossomas podem ser classificados, dependendo do método de preparação, como vesículas múlti -, oligo - e uni - lamelares, contendo várias, poucas ou somente uma bicamada lipídica (**Figura 1**)^{7,12,15,16}.

Figura 1 - Representação esquemática de diferentes tipos de lipossomas. MLV - Vesículas multilamelar (diâmetro entre 0,5 μm e 5 μm); GUV – Vesículas unilamelar gigante (diâmetro $\geq 1 \mu\text{m}$); LUV - Grandes vesículas unilamelares - (diâmetro entre 200 nm e 800 nm); e SUV - pequenas vesículas unilamelares, (diâmetro $\leq 100 \text{ nm}$). Figura baseada nas referências de número 6, 7, 12, 15 e 16



Fonte: elaborada pelos autores.

Existem várias técnicas de preparação de lipossomas baseadas principalmente na formação e hidratação do filme lipídico, as quais incluem o uso de procedimentos mecânicos (congelamento/descongelamento, sonicação, extrusão e microfluidização), uso de solventes orgânicos ou remoção de detergentes (desidratação e hidratação); tipos, quantidades e propriedades de cargas dos fosfolípidios; presença de íons no meio aquoso que promovem a formação de vesículas mais estáveis e com especificidade para determinadas biomoléculas e aplicação¹⁷.

4. Lipossomas e suas aplicações na medicina

Em 1995, foi lançado no mercado americano o *Doxil*[®] (Doxorrubicina lipossomal) para o tratamento de pacientes com câncer de ovário e sarcoma de Kaposi relacionado à síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS), sendo este o primeiro produto lipossomal nanométrico a obter aprovação regulamentar. Mais tarde, a *NeXstar Pharmaceuticals USA* também desenvolveu um produto lipossomal com daunorrubicina (*DaunoXome*[®]), que foi aprovado pela agência federal americana (*Food and Drug administration* - FDA), em 1996, para o tratamento do sarcoma de Kaposi associado ao vírus HIV. Posteriormente, mais alguns produtos tornaram-se disponíveis para o tratamento de vários tipos de câncer. Porém, embora o câncer fosse a área mais amplamente explorada em termos de produtos clinicamente aprovados usando os lipossomas como carregador, formulações lipossomais também foram desenvolvidas para o tratamento de outras doenças, além de se tornarem importantes sistemas carreadores no desenvolvimento de vacinas².

A solubilidade e a eficiência de entrega aos locais de ação das moléculas incorporadas nas formulações lipossomais são dependentes das características do tipo e da composição dos lipossomas aplicados; o número de bicamadas (lamelas), a adição de ligantes de superfície, a liberação do fármaco do sistema, a internalização dos lipossomas pelas células do tecido, bem como características físico-químicas que podem influenciar a eficácia terapêutica do fármaco^{4,18,19}.

4.1. Estratégias para entrega terapêutica de lipossomas

4.1.1. Lipossomas de longa circulação

Mesmo que os lipossomas imitem a membranas biológicas, geralmente, possuem um tempo de meia-vida curto quando na corrente sanguínea devido à sua rápida interação com as proteínas plasmáticas e captura pelos macrófagos do plasma levando à rápida degradação predominantemente no fígado e no baço. Assim, surgiu a necessidade de desenvolver lipossomas de longa circulação para melhorar a biodistribuição destes e, conseqüentemente, a retenção dos fármacos nos tecidos. Em algumas circunstâncias, a absorção de lipossomas pelos macrófagos é preferida quando eles são o alvo terapêutico, como em infecções e doenças que afetam essas células. A primeira estratégia usada para gerar lipossomas de longa circulação foi ajustar propriedades como tamanho e carga de superfície das vesículas baseado em mudanças na composição de seus constituintes (**Figuras 2A e 2B**). Os lipossomas com tamanhos pequenos (50 nm) não são reconhecidos pelas células do sistema retículoendotelial (RES) quando comparados com os de mesma composição, mas com tamanhos maiores (100 nm); pequenas vesículas unilamelares (SUV) permanecem mais tempo em circulação que as vesículas multilamelares de tamanhos maiores (MLV)¹⁹⁻²¹.

A modificação de superfície dos lipossomas foi outra estratégia desenvolvida para evitar a captura pelo RES. Inicialmente, foram utilizados gangliosídeos e derivados siálicos, como GM₁ (monossialogangliosídeo), para imitar a superfície da membrana dos eritrócitos e, algum tempo depois, polímeros hidrofílicos, como PEG (polietilenoglicol), com capacidade de conferir aos lipossomas um limite estérico devido à sua capacidade de formar uma camada superficial de caráter hidrofílico, melhorando a eficácia das moléculas / agentes encapsulados, pela redução da opsonização *in vivo* por proteínas plasmáticas e/ou outros componentes do soro e o não reconhecimento pelo RES^{22,23}. Isso não apenas reduz a eliminação da droga, prolonga a circulação sanguínea e promove o acúmulo nos locais-alvos, mas também atenua os efeitos colaterais²⁴.

Alvos terapêuticos que possuem estrutura e funções alteradas geralmente costumam ser mais beneficiados pela entrega passiva dos lipossomas. Um exemplo disso são os tecidos tumorais, em que o processo angiogênico é irregular, fazendo com que os vasos sanguíneos sejam formados de maneira incompleta e com arquitetura desordenada; apresentando espaços maiores nas junções intercelulares (poros) que facilitam a permeabilidade de estruturas em escala nanométrica para o interstício do tumor. Como o processo de drenagem linfática também é irregular, essas nanoestruturas acabam retidas no interstício tumoral por mais tempo, promovendo a liberação do fármaco em seu alvo terapêutico. Esse efeito é denominado Efeito de Permeabilidade e Retenção aumentada (EPR). Também foi observada morfologia semelhante de tecido com vazamento nos tecidos inflamados da doença inflamatória intestinal e artrite reumatoide inflamatória^{25,26}.

As formulações comercialmente disponíveis à base de lipossomas se aproveitam dessa distribuição passiva melhorada para locais de ação preferidos. Porém, em algumas situações, os lipossomas decorados com PEG se concentram numa área-alvo pelo efeito EPR, mas são incapazes de libertar eficientemente o fármaco. Foi também observado que esse revestimento pode inibir o escape endossomal dos fármacos após endocitose pelas células. Assim, uma distribuição homogênea dos lipossomas ao longo do tumor também pode não ser possível. Uma exigência estratégica aprimorada para a entrega de medicamentos a um local-alvo resultou no desenvolvimento do direcionamento ativo de drogas, oferecendo, assim, a possibilidade de um direcionamento mais específico^{27, 28}.

4.1.2. Lipossomas para Direcionamento ao local de ação

Os lipossomas conjugados a ligantes (**Figuras 2C, 2D e 2E**) com objetivo de promover uma entrega direcionada *in vivo* oferecem um vasto potencial para a entrega específica de fármacos a tipos celulares ou órgãos-alvos, que expressam seletivamente ou sobre-expressam ligantes específicos. Existem diversos tipos de ligantes disponíveis, tais como anticorpos, peptídeos/proteínas e hidratos de carbono, entre

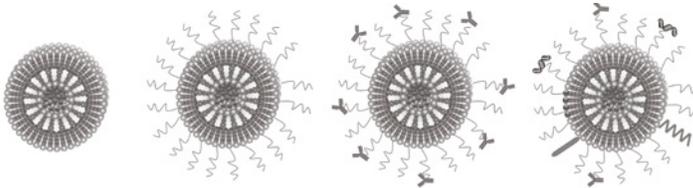
outros¹¹. Dentre os principais fatores fundamentais para um direcionamento ativo, estão: i) apresentação do receptor-alvo/antígeno pelo tecido doente em comparação aos tecidos não doentes; ii) propriedades de internalização no tecido-alvo; iii) capacidade de longa circulação de um lipossoma portador da unidade de direcionamento; e iv) Forma de ligação do ligante/anticorpo aos lipossomas⁴.

Uma das formas de direcionamento mais versáteis para o uso em lipossomas é a ligação de anticorpos à superfície da vesícula, particularmente anticorpos monoclonais, para criar os chamados imunolipossomas²⁹. Dentre as vantagens da utilização de anticorpos monoclonais, incluem-se a estabilidade e a maior avidéz de ligação devido à presença de dois locais de ligação na molécula. Como os conjuntos lipídicos da bicamada são estruturas dinâmicas, os ligantes de superfície acoplada têm uma alta liberdade de movimento para se posicionarem nas interações com o substrato. Porém, o potencial em direcionamento dos imunolipossomas é limitado devido à fraca farmacocinética e imunogenicidade *in vivo*³⁰. Portanto, cuidados devem ser tomados com a modificação da superfície dos lipossomas com ligantes, especialmente anticorpos ou peptídeos, de modo que a conjugação não altere a estrutura do ligante ou cause um impacto negativo na sua atividade²⁴.

Vários estudos têm sido conduzidos sobre como a ligação do ligante afeta a eficiência do sistema de liberação de drogas-alvo (SLDA). Geralmente, a apresentação do ligante/anticorpo nas extremidades distais do PEG é mais eficiente para os SLDA. Os lipossomas-alvo devem ser preparados com o ligante protegido durante a circulação, mas apresentável quando atinge um local-alvo. Para o desenvolvimento de um SLDA, é necessário compreender a representação dos receptores-alvo e antígeno; o ligante de direcionamento deve distinguir as células-alvo das células normais, para evitar a ligação inespecífica; o receptor/antígeno deve ser exclusivamente expresso no tecido-alvo, ou o alvo deve ter expressão relativamente alta em comparação com as células normais; é preferível que o ligante induza endocitose mediada por receptor ou fusão do lipossoma com a membrana, um ligante que

se liga ao receptor sem qualquer internalização é de pouca utilidade e permanecerá no espaço intersticial³¹⁻³³.

Figura 2 – Evolução das modificações utilizadas nas preparações lipossomais para facilitar a entrega passiva ou ativa de fármacos. – A- Lipossoma Convencional. B – Imunolipossoma com anticorpo covalentemente ligado à membrana lipídica. C- Lipossoma de longa circulação, recoberto com polímero como o PEG. D – Imunolipossoma de longa circulação, simultaneamente possui polímero e anticorpo ancorados na bicamada lipídica. E – Nova geração de lipossomas com superfície modificada por polímero, anticorpo, com DNA e incorporação de componentes viral^{6,7}



Fonte: Elaborada pelos autores.

4.1.3. Outras estratégias

Outra estratégia para o desenvolvimento de SLDA é a preparação de sistemas cuja liberação do fármaco ou molécula bioativa é desencadeada por dispositivos de direcionamento sensíveis a determinados estímulos, os quais permitem a regulação da liberação de fármacos a partir dos lipossomas formados. As estratégias para essa liberação desencadeada incluem aquelas dependentes da fisiologia, como i) pH, e ii) baseadas em enzimas; e as que são dependentes de estímulos externos, iv) ultrassom, v) temperatura (termossensível), vi) luz (fotosensível) e vii) campo magnético (magneto lipossomas)³⁴.

Tecidos patológicos frequentemente exibem diferenças fisiológicas características em seu ambiente local comparado com os tecidos normais, as quais podem ser aplicadas no desenvolvimento de um SLDA de liberação desencadeada. Os lipossomas sensíveis ao pH (LSP) explo-

ram as condições de pH mais baixas presentes nos tumores ou locais de inflamação. Esses sistemas (LSP) são construídos para manterem suas estruturas estáveis no pH do sangue (7,4), e em pH mais baixo (6,0) ocorrer a degradação da estrutura com posterior liberação do material carregado pela vesícula. Uma abordagem na concepção desses sistemas é a utilização de peptídeos fusogênicos, também conhecidos como peptídeos de inserção, por exemplo, GALA (ácido glutâmico-alanina-leucina-alanina)³⁵. Em condições de pH neutro e elevado, esses peptídeos são monoméricos e solúveis em água, enquanto que a pH ácido tornam-se hidrofóbicos e assumem uma estrutura de hélice transmembrana monomérica que se insere na membrana, conduzindo à fusão dos lipossomas com a membrana celular. Em um pH de 7,4, o peptídeo assegura que os lipossomas não se fundirão com as células. No entanto, em áreas de baixo pH (um tumor, inflamação ou miocárdio isquêmico), o efeito do peptídeo aumentará a captação celular pela fusão dos lipossomas e a liberação de carga³⁶.

Os avanços na composição lipídica dos lipossomas vêm contribuindo para o desenvolvimento de SLDA mediada por estímulos externos; como também o surgimento de novas ferramentas utilizadas como gatilho para destruição da vesícula no local desejado. Os lipossomas termosensíveis (LTS) são lipossomas com capacidade de liberar o fármaco em variações de calor. A hipertermia leve localmente aplicada já é usada para a quimioterapia combinada. A hipertermia é quimioterápica não apenas por ser diretamente citotóxica nas células (ablação por calor), mas também por aumentar a permeabilidade vascular (extravasamento da vesícula lipossomal melhorado) e aumentar a fluidez da membrana celular (melhor difusão de drogas)^{37,38}. A utilização de LTS composto por lisolipídeos ou polímeros pode melhorar os seus efeitos citotóxicos. Os lisolipídeos são estruturalmente diferentes dos fosfolipídios utilizados na composição dos lipossomas convencionais, pois possuem um grande grupo de cabeça polar e uma única cauda hidrofóbica que promove a formação de micelas. Quando o calor é aplicado ao LTS, suas bicamadas lipídicas entram em um estado de transição de fase gel-fluido com os lisolipídios se acumulando em pontos de

transição para formar poros estáveis, invertendo-se em estruturas semelhantes a micelas. Esses conjuntos de poros desestabilizam fortemente os lipossomas, levando à liberação do fármaco. Além de causar desestabilização da bicamada lipídica, os lisolipídios diminuem a T_c (temperatura de transição de fase) dos fosfolipídios termosensíveis para 39°C–40°C, significando que pode ser clinicamente aplicável³⁷.

4.2. Aplicações na Medicina

Os lipossomas têm sido usados nas mais variadas indicações médicas, incluindo câncer, infecções e desordens da pele. A maioria das pesquisas com lipossomas são voltadas ao diagnóstico ou tratamento do câncer. Os lipossomas, sendo quimicamente versáteis, também são desenvolvidos para diferentes vias de administração, como parenteral, dérmica/transdérmica, pulmonar e oral. Cada rota possui suas vantagens e desvantagens, por exemplo, os lipossomas para administração sistêmica são úteis para a solubilização e estabilização de vários fármacos protegendo-os do meio fluido biológico, reduzindo a toxicidade não específica do fármaco livre, e com algumas modificações no direcionamento do fármaco ou molécula bioativa; e assim promovendo a entrega intracelular do material encapsulado na vesícula. No entanto, a administração parenteral frequentemente causa desconforto aos pacientes, especialmente em doenças como o câncer, em que são submetidos a múltiplos tratamentos de infusão. Nesses casos, a distribuição lipossomal pulmonar ou oral pode ser de grande utilidade³⁹⁻⁴¹.

Além da aplicação de lipossomas para a administração de drogas, estes também desempenham um papel importante nos campos da i) imagiologia molecular para diagnóstico e monitoramento da progressão do tratamento de doenças⁴¹ ii) potentes sistemas para distribuição de vacinas⁴²; iii) técnicas analíticas como cromatografia líquida, iv) imunoenaios e v) como biossensores⁴³.

4.3. Preparações lipossomais disponíveis para uso clínico

Atualmente, existem alguns medicamentos à base de lipossomas disponíveis no mercado para uso humano, como *Doxil*[®], *Ambisome*[®] e

DepoDur[™]. A maior parte das formulações de fármacos lipossomais está disponível para aplicações intravenosas e intramusculares, para distribuição de fármacos anticâncer, antifúngicos, anti-inflamatórios e terapia gênica⁴⁴.

Três formulações de anfotericina b (AmB) lipossomais (*AmBisome*[®]) ou contendo lipídios (ABLCL, *Abelcet*[®] e ABCD, *Amphotec*[®]) estão disponíveis no mercado, as quais são capazes de reduzir a toxicidade do fármaco livre⁴⁵.

Os sistemas de administração de fármacos lipossomais atingiram a maioria desde a sua inicial concepção, como modelo de membrana, há mais de cinco décadas. A evolução dessas vesículas pode ser verificada em mais de uma dúzia de sistemas de entrega de medicamentos ou moléculas bioativas encapsuladas em lipossomas, atualmente aprovadas pelo FDA para uso no mercado e em diferentes fases de estudos clínicos (**Tabela 2**). A opinião positiva da FDA sobre os lipossomas, juntamente com outros sistemas de administração de medicamentos nanoestruturados aprovados clinicamente, favoreceu os esforços para comercialização destes e também para os estudos e o desenvolvimento de novos sistemas e formas de aplicações pelas entidades industriais e acadêmicas⁴⁷.

Tabela 2 – Produtos à base de lipossomas aprovados ou em fase de estudos clínicos

Produto clínico (Agente ativo)	Composição	Indicação	Indústria farmacêutica	Fase clínica
<i>Doxil</i> ® (Doxorrubicina)	HPCsoja/ CHOL/DSPE- PEG	Sarcoma de Kaposi	<i>Sequus Pharmaceuticals</i>	Aprovado
<i>DaunoXome</i> ® (Daunorrubicina)	DSPC/CHOL	Sarcoma de Kaposi	<i>Nexstar Pharmaceuticals</i>	Aprovado
<i>Myocet</i> ® (Doxorrubicina)	EPC/CHOL	Câncer de mama	<i>Elan Pharma</i>	Aprovado
<i>Depocyt</i> ® (Citarabina)	DOPC/DPPG/ CHOL / Trioleína	Meningite linfomatosa	SkyePharma	Aprovado
<i>Ambisome</i> ® (Anfotericina)	HPCsoja/ DSPPC/CHOL	Infecções fúngicas	<i>Fujisawa USA e Nexstar Pharmaceuticals</i>	Aprovado
LEP-ETU (Paclitaxel)	DOPE/CHOL/ Cardiolipina	Câncer de mama, ovários e pulmão	NeoPharm	Fase I
LEM-ETU (Mitoxantrona)	DOPE/CHOL/ Cardiolipina	Leucemia e câncer de mama, estômago, fígado e ovários	<i>NeoPharm</i>	Fase I
<i>Aroplatin</i> (Análogo da oxaliplatina)	DMPC/DMPG	Câncer colorretal	<i>Antigenics</i>	Fase II
<i>Lipoplatin</i> (Displatina)	SoyPC/DPPG/ CHOL	Diversos tipos de câncer	<i>Regulon</i>	Fase I/II
<i>Marqibo</i> (Vincristina)	DSPPC/CHOL/ Esfingosina	Linfoma não Hodgins	<i>Inex Pharm</i>	Fase II/III
<i>Nyotran</i> (Nistatina)	DMPC/DMPG/ CHOL	Infecções fúngicas	<i>Aronex Pharm</i>	Fase II/III

Fontes: Dosio e Cattel⁴⁶.

5. Lipossomas na indústria alimentícia

A utilização de lipossomas na indústria de alimentos é uma atividade emergente e se baseia em suas propriedades já relatadas em estudos de desenvolvimento, caracterização e aplicação biomédica, como estabilidade cinética, baixo custo para desenvolvimento e alta biocompatibilidade⁴⁸. Proporcionalmente, um baixo número de publicações científicas abordando a utilização de lipossomas para o carregamento de compostos ou moléculas alimentares são descritas na literatura, o que, segundo alguns pesquisadores, são decorrentes do pouco entendimento dos constituintes desses sistemas com componentes alimentares⁴⁹.

Contudo, o estudo de Shukla⁴⁹, o qual realizou uma busca de artigos científicos na base de dados *PubMed*, entre os anos de 2006 e 2017, utilizando as palavras-chave “nanotecnologia”, “lipossoma”, “nanopartículas” e “alimentos”, observou um perfil crescente de trabalhos que correlacionam a utilização de lipossomas no desenvolvimento de produtos alimentícios; os quais os cientistas começaram a usá-los no carregamento de constituintes funcionais como proteínas, enzimas, polissacarídeos e vitaminas com diferentes objetivos, que serão descritos nesta sessão.

5.1. Aplicações em laticíneos

A utilização de lipossomas na indústria de laticínios é uma das mais bem descritas na literatura nas últimas duas décadas. Lipossomas foram desenvolvidos para encapsular proteínases, com o objetivo de promover a inibição da proteólise da caseína, resultando na produção de queijos mais firmes após a conclusão da fermentação⁵⁰; uma melhora no tempo de produção de queijos estilo Saint-Paulin também foi relatada⁵¹. Estudos mais recentes realizados por Benech e colaboradores⁵² avaliaram a adição de lipossomas contendo lipases na produção de queijo cheddar e foram observados redução na firmeza do queijo e aumento da elasticidade e da coesão deste, proporcionando melhora nas propriedades organolépticas desse queijo.

Além de potencializar o tempo de processamento de laticínios por meio do carregamento de proteases e melhoria de propriedades organolépticas com lipases, lipossomas contendo lactases também foram desenvolvidos por Matsuzaki⁵³ e Rao⁵⁴ com a finalidade de promover a digestão lenta da lactose no desenvolvimento de produtos lácteos para intolerantes e aumentar a estabilidade da enzima durante o armazenamento. Vitaminas também são encapsuladas para aplicação em suplementos de produtos lácteos, melhorando sua qualidade nutricional, impedindo a degradação desses micronutrientes⁵⁵.

5.2. Utilização nos produtos para suplementação de alimentos e estabilização de componentes alimentares

Produtos alimentícios suplementados com micronutrientes demonstram considerável interesse por parte do consumidor⁵⁶, porém alguns fatores como a baixa estabilidade e características organolépticas indesejáveis, por exemplo no caso do óleo de peixe, limitam suas aplicações em desenvolvimento de alimentos. Dessa forma, estudos utilizando lipossomas foram desenvolvidos com o objetivo de reduzir ou eliminar tais limitações. O óleo de peixe, rico em Ômega 3, vem sendo encapsulado em lipossomas para serem usados na suplementação de iogurte, com o objetivo de alterar as características organolépticas do óleo de peixe livre^{57 58}.

Estudos com o encapsulamento de vitaminas em lipossomas em sua maioria têm como objetivo aumentar a bioviabilidade e a estabilização destas ao prevenir a degradação ocasionada por exposição à luz e à variação de temperaturas, o que representava um ponto limitante no desenvolvimento de alimentos suplementados por essas moléculas. O ácido ascórbico (vitamina C) quando em formulações lipossomais, em estudos de Taylor⁴⁸, apresentou uma melhor estabilidade, com atividade por um período maior do que a vitamina livre, que, quando em suspensão, perdeu atividade após uma semana de armazenamento. A redução da degradação após exposição a luz e a temperatura também foi observada por Lee S.C.⁵⁹, com resultados semelhantes com a vitamina A e α -tocoferol em formulações lipossomais, indicando a

eficácia dessas preparações em proteger, assegurar a bioatividade e valor nutricional desses micronutrientes durante o processo de desenvolvimento de alimentos suplementados e na estabilidade destes.

5.3. Detecção de patógenos alimentares e toxinas

O controle microbiológico de alimentos é ferramenta essencial na produção de produtos alimentícios e visa assegurar a saúde do consumidor por meio da identificação de agentes patogênicos e aumentar a validade desse produto. Contudo, técnicas convencionais de identificação de patógenos em alimentos não apresentam alta sensibilidade ou apresentam custo elevado. Dessa forma, alguns estudos vêm sendo desenvolvidos para aumentar a sensibilidade e a especificidade desses testes associando a nanotecnologia.

Sensores utilizando nanopartículas (ouro, *quantum dots* e de sílica) são ferramentas da nanotecnologia estudadas para detecção de patógenos e toxinas presentes em alimentos, as quais se baseiam nas propriedades ópticas (sensores ópticos) ou eletrônicas (sensores eletroquímicos) dos nanomateriais⁶⁰⁻⁶². Os lipossomas demonstram maior biocompatibilidade e biodegradabilidade em relação às nanopartículas aplicadas nesses sensores, tornando o sistema mais atrativo para a identificação de xenobióticos⁶³⁻⁶⁵. Os lipossomas podem ser utilizados não só para encapsular moléculas indicadoras, mas também para a fixação destas na superfície dos sensores, com o objetivo de aperfeiçoar a transdução de sinais no sistema de análise⁶².

A criação de imunolipossomas contendo anticorpos específicos para detecção de patógenos vem sendo alvo de alguns estudos: **(i)** detecção rápida para *Salmonella spp.* por separação imunomagnética / imunolipossoma⁶⁶; **(ii)** detecção de *S. Typhimurium* com o uso de imunolipossomas e cromatografia⁶⁷; **(iii)** identificação e quantificação de partículas virais para o controle de qualidade de alimentos, pela alteração de cor (azul para rosa) do ácido siálico na presença do vírus influenza⁶⁸; e **(iv)** detecção de toxina tetânica, botulínica e colérica, pelo uso de lipossomas contendo gangliósídeos⁶⁹.

6. Referências

1. BANGHAM A. D., STANDISH M M, WATKINS J. C. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. **Journal of Molecular Biology**, v.13, p.238-52, 1965.
2. BULBAKE, U. et al. Liposomal formulations in clinical use: An updated review. **Pharmaceutics**, v.9, n.2, pii. E12. 2017.
3. PATTNI, B. S.; CHUPIN, V. V.; TORCHILIN, V. P. New Developments in Liposomal Drug Delivery. **Chemical Reviews**, v.115, n.19, p.10938-66, 2015.
4. TORCHILIN, V.P. Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers, **Nature Review Drug Discovery**, v.4, n.2,p. 145-60 2005.
5. GREGORIADIS, G. The Carrier Potential of Liposomes in Biology and Medicine. **New England Journal of Medicine**, v. 295, n. 14, p. 765–770, 1976.
6. SZOKA JR, F., PAPAHAADJOPOULOS, D. Comparative Properties and Methods of Preparation of Lipid Vesicles (Liposomes), **Annual Review of Biophysical and Bioengineer**, v.9, p.467-508, 1980.
7. VEMURI S., RHODES C.T., Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review, **Pharmaceutica Acta Helvetia**, v.70, n.2, p.:95-111, 1995.
8. CHATTERJEE S., BANERJEE D.K., Preparation, isolation, and characterization of liposomes containing natural and synthetic lipids, **Methods in Molecular Biology**, v.199, p.3-16, 2002.
9. RAVICHANDRAN, R. Nanotechnology applications in food and food processing: innovative green approaches, opportunities and uncer-

- tainties for global market. **International Journal of Green Nanotechnology: Physics and Chemistry**, v. 1, n. 2, p. P72-P96, 2010.
10. HE, Xiaojia; HWANG, Huey-Min. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. **journal of food and drug analysis**, v. 24, n. 4, p. 671-681, 2016.
 11. TAYLOR, T. Matthew et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 7-8, p. 587-605, 2005.
 12. WALDE P. & ICHIKAWA S. Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications, **Biomolecular Engineering**, v.18,p.143–177, 2001.
 13. ULRICH S. Anne, Biophysical Aspects of Using Liposomes as Delivery Vehicles, **Bioscience Reports**, v. 22, n.2, p.129-150, 2002.
 14. PATIL Yogita P, JADHAV J. Sameer, Novel methods for liposome preparation, **Chemistry and Physics of Lipids**, v.177, n.8– 18, 2014.
 15. GÓMEZ-HENS A., FERNANDEZ-ROMERO J.M. The role of liposomes in analytical processes, **Trac-Trends Anal of Chemistry**, v.24, p.9-19, 2005.
 16. EDWARDS K.A, BAEUMNER A.J. Liposomes in analyses, **Talanta**, v.68, p. 1421–1431, 2006.
 17. FREZARD, Frédéric et al . Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 511-518, 2005.
 18. ISRAELACHVILI, J. N.; MARCELJA, S.; HORN, R. G. Physical principles of membrane organization. **Quarterly reviews of biophysics**, v. 13, n. 2, p. 121–200, 1980.

19. ALLEN, T. M.; EVEREST, J. M. Effect of liposome size and drug release properties on pharmacokinetics of encapsulated drug in rats. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 226, n. 2, p. 539–44, 1983.
20. KELLY, C.; JEFFERIES, C.; CRYAN, S.-A. Targeted Liposomal Drug Delivery to Monocytes and Macrophages. **Journal of Drug Delivery**, v. 2011, p. 1–11, 2011.
21. GABIZON, A.; PAPAHADJOPOULOS, D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 85, p. 6949–6953, 1988.
22. MARUYAMA, K. et al. Targetability of novel immunoliposomes modified with amphipathic poly(ethylene glycol) s conjugated at their distal terminals to monoclonal antibodies. **BBA - Biomembranes**, v. 1234, n. 1, p. 74–80, 1995.
23. SERCOMBE, L. et al. Advances and challenges of liposome assisted drug delivery, **Frontiers in Pharmacology**, v.1, n.6, p.286, 2015.
24. IYER, A. K. et al. Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, **Drug Discovery Today**, v.11, n.17-18, p. 812-8, 2006.
25. YHEE, J. et al. The EPR Effect in Cancer. In: **Cancer Targeted Drug Delivery: An Elusive Dream**. p. 621–632, doi:10.1007/978-1-4614-7876-8_23, 2013.
26. PATEL, N. R. et al. Nanopreparations to overcome multidrug resistance in cancer, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n.13-14, p.1748-62, 2013.

27. YOKOI, K. et al. Tumor type and organ type dependent differences of vascular permeability to pegylated liposomal doxorubicin. **Cancer Research**, v. 73, n. 8 Supplement, p. 4973–4973, 2014.
28. BENDAS, G. Immunoliposomes: a promising approach to targeting cancer therapy. **BioDrugs : clinical immunotherapeutics, biopharmaceuticals and gene therapy**, v. 15, n. 4, p. 215–224, 2001.
29. .WILLIS, M., FORSSEN, E Ligand-targeted liposomes, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.29, v.3, p. 249-271, 1998.
30. KIRPOTIN, D. et al. Sterically stabilized anti-HER2 immunoliposomes: design and targeting to human breast cancer cells in vitro. **Biochemistry**, v. 36, n. 1, p. 66–75, 1997.
31. MARUYAMA, K. et al. Prolonged circulation time in vivo of large unilamellar liposomes composed of distearoyl phosphatidylcholine and cholesterol containing amphipathic poly(ethylene glycol). **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism**, v. 1128, n. 1, p. 44–49, 1992.
32. SAWANT, R. R.; TORCHILIN, V. P. Challenges in Development of Targeted Liposomal Therapeutics. **The AAPS Journal**, v. 14, n. 2, p. 303–315, 2012.
33. SOSUNOV, E. A. et al. pH (low) insertion peptide (pHLIP) targets ischemic myocardium. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 1, p. 82–86, 2013.
34. CHEN Y., BOSE A., BOTHUN G.D., Controlled Release from Bilayer-Decorated Magnetoliposomes via Electromagnetic Heating. **ACS Nano**, v.4, n.6, p.3215-21, 2010
35. LI, W.; NICOL, F.; SZOKA, F. C. GALA: A designed synthetic pH-responsive amphipathic peptide with applications in drug and gene

- delivery, **Advanced Drug Delivery Reviews**, v,56, n.7, p.967-85, 2004.
36. MILLS, J. K.; NEEDHAM, D. Lysolipid incorporation in dipalmitoyl-phosphatidylcholine bilayer membranes enhances the ion permeability and drug release rates at the membrane phase transition. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1716, n. 2, p. 77–96, 2005.
37. WUST, P. et al. Hyperthermia in combined treatment of cancer. **The Lancet Oncology**, v. 3, n. 8, p. 487–497, 2002.
38. FRICKER, G. et al. Phospholipids and lipid-based formulations in oral drug delivery, **Pharmaceutical Research**, v.27, n.8, p.1469-86, 2010.
39. HAUSS, D. J. Oral lipid-based formulations **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.59, n.7, p.667-76, 2007.
40. SHRESTHA, H.; BALA, R.; ARORA, S. Lipid-Based Drug Delivery Systems. **Journal of Pharmaceutics**, v. 2014, p. 1–10, 2014.
41. SILINDIR, M. et al. Liposomes and their applications in molecular imaging. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, p. 401–415, 2012.
42. ALLISON, A. C.; GREGORIADIS, G. Liposomes as immunological adjuvants. **Nature**, v. 252, n. 5480, p. 252, 1974.
43. GÓMEZ-HENS, A.; MANUEL FERNÁNDEZ-ROMERO, J. The role of liposomes in analytical processes, **TrAC-Trends in Analytical Chemistry**, v.1,n.24, p.9-19, 2005.
44. CHANG, H. I.; YEH, M. K. Clinical development of liposome-based drugs: Formulation, characterization, and therapeutic efficacy, **International Journal of Nanomedicine**, v.7, p.49–60, 2012.

45. P. Goyal et al.: Liposomal drug delivery systems – Clinical applications, **Acta Pharmaceutical**, v.55, n.1, p.25. 55, 2005.
46. IMMORDINO, M. L.; DOSIO, F.; CATTEL, L. Stealth liposomes: Review of the basic science, rationale, and clinical applications, existing and potential, **International Journal of Nanomedicine**, v.1, n.3, p.297-315, 2006.
47. ZYLBERBERG, C.; MATOSEVIC, S. Pharmaceutical liposomal drug delivery: a review of new delivery systems and a look at the regulatory landscape, **Drug Delivery**, v..23, n.9, p.3319-3329, 2016.
48. TAYLOR, T. Matthew et al. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 7-8, p. 587-605, 2005.
49. SHUKLA, Shruti et al. Current demands for food-approved liposome nanoparticles in food and safety sector. **Frontiers in microbiology**, v. 8, p. 2398, 2017.
50. LAW, Barry A.; KING, Joseph S. Use of liposomes for proteinase addition to Cheddar cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 52, n. 1, p. 183-188, 1985.
51. ALKHALAF, WALID et al. Liposomes as proteinase carriers for the accelerated ripening of Saint-Paulin type cheese. **Journal of Food Science**, v. 53, n. 6, p. 1674-1679, 1988.
52. BENECH, R.-O. et al. Antibacterial activities of nisin Z encapsulated in liposomes or produced in situ by mixed culture during cheddar cheese ripening. **Applied and environmental microbiology**, v. 68, n. 11, p. 5607-5619, 2002.
53. MATSUZAKI, M.; MCCAFFERTY, F.; KAREL, M. The effect of cholesterol content of phospholipid vesicles on the encapsulation and

- acid resistance of β -galactosidase from *E. coli*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 24, n. 4, p. 451-460, 1989.
54. RAO, D. R.; CHAWAN, C. B.; VEERAMACHANENI, R. Liposomal encapsulation of β -galactosidase: comparison of two methods of encapsulation and in vitro lactose digestibility. **Journal of food biochemistry**, v. 18, n. 4, p. 239-251, 1994.
55. BANVILLE, C.; VUILLEMARD, J. C.; LACROIX, C. Comparison of different methods for fortifying Cheddar cheese with vitamin D. **International Dairy Journal**, v. 10, n. 5-6, p. 375-382, 2000.
56. SIRO, Istvan et al. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.
57. IAFELICE, Giovanna et al. Development of functional spaghetti enriched with long chain omega-3 fatty acids. **Cereal Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 146-151, 2008.
58. GHORBANZADE, Tahere et al. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. **Food chemistry**, v. 216, p. 146-152, 2017.
59. HWANG, Yong-Il; LUDESCHER, Richard D. Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 35, n. 4, p. 358-363, 2002.
60. ÜZER, Ayşem et al. Electrochemical determination of food preservative nitrite with gold nanoparticles/p-aminothiophenol-modified gold electrode. **International journal of molecular sciences**, v. 17, n. 8, p. 1253, 2016.
61. PÉREZ-LÓPEZ, Briza; MERKOÇI, Arben. Nanomaterials based biosensors for food analysis applications. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 11, p. 625-639, 2011.

62. INBARAJ, B. Stephen; CHEN, B. H. Nanomaterial-based sensors for detection of foodborne bacterial pathogens and toxins as well as pork adulteration in meat products. **Journal of food and drug analysis**, v. 24, n. 1, p. 15-28, 2016.
63. HSIEH, Y.-F. et al. Properties of liposomes prepared with various lipids. **Journal of food science**, v. 67, n. 8, p. 2808-2813, 2002.
64. LARIDI, R. et al. Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. **International dairy journal**, v. 13, n. 4, p. 325-336, 2003.
65. WEN, Hsiao-Wei et al. A novel extraction method for peanut allergenic proteins in chocolate and their detection by a liposome-based lateral flow assay. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 3-4, p. 564-569, 2005.
66. SHIN, Junghee; KIM, Myunghee. Development of liposome immunoassay for salmonella spp. using immunomagnetic separation and immunoliposome. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 18, n. 10, p. 1689-1694, 2008.
67. SHUKLA, Shruti et al. Development of immunoliposome-based assay for the detection of Salmonella Typhimurium. **European Food Research and Technology**, v. 234, n. 1, p. 53-59, 2012.
68. SHINDE, Siddhesh B.; FERNANDES, Clara B.; PATRAVALE, Vandana B. Recent trends in in-vitro nanodiagnostics for detection of pathogens. **Journal of controlled release**, v. 159, n. 2, p. 164-180, 2012.
69. SINGH, Anup K.; HARRISON, Suzanne H.; SCHOENIGER, Joseph S. Gangliosides as receptors for biological toxins: development of sensitive fluoroimmunoassays using ganglioside-bearing liposomes. **Analytical chemistry**, v. 72, n. 24, p. 6019-6024.

CAPÍTULO 4

Síntese verde de nanomateriais

Luciano P. Silva^{1,2*}; Beatriz S. Carvalho^{1,2}; Cíntia C. Bonatto^{1,3}; Júlia M. Pupe^{1,2}; Tatiane M. Pereira^{1,2}; Thalita F. Araujo^{1,2}

1. Introdução

Duas abordagens principais são utilizadas para síntese de nanomateriais, as quais são conhecidas em nanociência e nanotecnologia como estratégias *top-down* (de cima para baixo) e estratégias *bottom-up* (de baixo para cima). A estratégia *top-down* consiste na desconstrução de um determinado material macroestruturado (*bulk*), geralmente por técnicas de nanolitografia ou por moagem de alta energia, até a obtenção do produto final nanoestruturado. Essa abordagem é utilizada para produção em escala, mas são observadas dificuldades para obtenção de homogeneidade nas características do produto final. A outra abordagem, *bottom-up*, segue o caminho oposto, no qual a nucleação, visando ao crescimento, ocorre a partir de átomos ou moléculas individuais para a formação das nanoestruturas. A abordagem *bottom-up* permite controlar e modular diversos parâmetros de síntese, como o tamanho e a forma das nanoestruturas, sendo comumente a mais utilizada.

1.Laboratório de Nanobiotecnologia (LNANO), Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasil

2.Instituto de Ciências Biológicas (IB), Universidade de Brasília, Brasil

3.Teclinapse Tecnologia da Informação, Brasil

* E-mail: luciano.paulino@embrapa.br

Diversas rotas químicas e físicas são utilizadas para a síntese *bottom-up* de nanossistemas a partir de seus precursores. No entanto, a maioria desses métodos inclui a utilização de solventes tóxicos, envolve a geração de resíduos nocivos para a saúde e o meio ambiente, ou ainda tende a resultar em um consumo de energia alto em rotas geralmente complexas e com múltiplos passos. Nesse sentido, a busca pelo desenvolvimento de procedimentos visando à obtenção de nanomateriais com ampla aplicabilidade tecnológica e superando alguns desafios relacionados com os métodos de síntese tradicionais constitui iminente foco de estudos voltados para pesquisa, desenvolvimento e inovação em nanotecnologia. Uma abordagem promissora para alcançar esse objetivo é explorar a vasta gama de recursos biológicos disponíveis na natureza por meio da chamada síntese biológica ou mais comumente denominada síntese verde^{1,2}.

Síntese verde é a designação dada às rotas de síntese que utilizam produtos químicos relativamente atóxicos, biodegradáveis e de custo baixo para sintetizar materiais, tendo tipicamente como fonte primária ou iniciador da rota um organismo biológico ou partes dele (órgãos, tecidos, células, extratos ou metabólitos). Dentre os recursos biológicos, aqueles oriundos dos animais, vegetais, algas, fungos, bactérias, vírus e ampla gama de coprodutos, subprodutos e resíduos derivados de processos agropecuários, aquícolas e florestais envolvendo alguns desses organismos³ apresentam potencial e muitos já foram reconhecidos para utilização nas rotas de síntese verde, os quais, quando aplicados para formação de nanomateriais, se enquadram na chamada nanotecnologia verde⁴.

De fato, a utilização racional de recursos biológicos oriundos da biodiversidade e das cadeias produtivas animais, vegetais e microbianas constitui uma etapa importante a ser avaliada na aplicação do conceito de bioeconomia, no que tange à sustentabilidade das atividades humanas⁵. Assim, a nanotecnologia verde é uma abordagem em consonância com essa preocupação crescente com questões relacionadas à sustentabilidade na medida em que utiliza métodos e materiais que

visam à geração de nanomateriais alinhados com muitos dos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS)⁶. Esse conceito oferece oportunidades únicas quanto à utilização de biomoléculas ou metabólitos secundários de diversos organismos vivos porque esses insumos, quando utilizados para produção de nanomateriais como nanopartículas (metálicas, poliméricas e lipídicas), lipossomas e emulsões, apresentam características novas que possibilitam uma vasta gama de aplicações inovadoras e sustentáveis.

Dessa forma, a síntese verde de nanomateriais (processos baseados em princípios da química verde) pode ser realizada utilizando organismos procariontes ou eucariontes (incluindo microrganismos, plantas e animais) ou partes deles; e pode ocorrer no meio intracelular ou extracelular^{1,2,7}. Nesse caso, os componentes biológicos presentes (metabólitos primários e secundários) são os principais constituintes para a formação de nanomateriais que, no caso de nanopartículas metálicas, atuam como agentes biorredutores e estabilizantes⁸⁻¹⁰; no caso de nanopartículas poliméricas, atuam como blocos essenciais para a estruturação e revestimento¹¹⁻¹⁴; no caso de lipossomas, atuam como constituintes primários para formação¹⁵; e, no caso das emulsões, atuam como constituintes fundamentais para obtenção das propriedades distintas das fases dispersa e contínua^{16,17}.

Em quase todos os casos, em particular quando se almeja a obtenção de uma suspensão estável coloidalmente ou com propriedades físico-químico-biológicas específicas, compostos oriundos de recursos biológicos, além de fornecerem uma camada estabilizante (cobertura) na superfície das nanoestruturas e evitar agregação, possibilitam a emergência de propriedades bioativas relevantes. Adicionalmente, nanomateriais obtidos por rotas de síntese verde apresentam como características almejadas do ponto de vista de sustentabilidade o fato de serem ecoamigáveis (utilizam solventes menos tóxicos e/ou recursos renováveis); biocompatíveis (podem ser empregados diretamente a organismos-alvos); simples (produção em número de etapas menor); biodegradáveis (podem ser degradados por rotas biológicas); custo de produção baixo; e ainda rendimento alto.

Dentre as aplicações de nanomateriais baseados em abordagens de nanotecnologia verde, podem ser destacadas aquelas voltadas para entrega e liberação sustentada de drogas (fármacos e hormônios)^{12-14,18}, insumos agropecuários (fertilizantes, vacinas e pesticidas)¹⁹, cosméticos (essências e cremes)²⁰ e biotecnológicos (enzimas)²¹; desenvolvimento de superfícies funcionais (películas comestíveis e embalagens ativas para proteção de alimentos)²²; elaboração de sensores para diagnóstico de doenças, infecções e contaminações com detecção rápida e sensível²³; desenvolvimento de sistemas para transferência de genes com eficiência aumentada²⁴; produção de materiais para aplicação em técnicas de diagnóstico por contraste e imageamento²⁵; produção de materiais para a separação e purificação de células, organelas e moléculas²⁵; produção de materiais para o controle de microrganismos patogênicos e pragas^{8-10,23,26}; desenvolvimento de catalisadores com desempenho aumentado²⁷; desenvolvimento de sistemas de remediação utilizados para remoção de metais pesados e contaminantes de efluentes²⁸; desenvolvimento de estratégias inovadoras para área forense relacionada à revelação de impressões digitais latentes e identificação de componentes moleculares²⁹; indústria têxtil com a produção de tecidos com propriedades especiais, incluindo a ação antibacteriana e antifúngica³⁰; e, até mesmo, para biofabricação relacionada à produção de miméticos de órgãos e tecidos para medicina regenerativa e triagem de substâncias bioativas³¹.

Tendo em vista o interesse crescente de pesquisadores, estudantes e empreendedores nas rotas sustentáveis para síntese de nanomateriais, o presente capítulo tem como objetivo apresentar noções gerais sobre nanotecnologia verde no que se refere aos recursos biológicos empregados no desenvolvimento das rotas de síntese, assim como contextualizar alguns desafios atuais e conjecturar perspectivas futuras quanto ao uso de diferentes nanomateriais produzidos por estratégias ecoamigáveis.

2. Recursos biológicos utilizados na síntese de nanomateriais

Tendo em vista que as reações de síntese verde de nanomateriais visam ao aproveitamento racional de recursos biológicos oriundos da biodiversidade e das diversas cadeias produtivas, inúmeros materiais podem ser utilizados como precursores desses processos⁵. Dentre esses recursos biológicos, estão incluídos microrganismos, macrofungos, algas, plantas, animais, assim como a diversidade de compostos produzidos por eles (metabólitos primários e secundários) e materiais oriundos de atividades agrícolas, florestais, agroindustriais, aquícolas e pecuárias, os quais são fontes de moléculas relevantes do ponto de vista nanotecnológico. Esses podem atuar como agentes para cobertura de superfície, compostos bioativos, surfactantes, estabilizadores e/ou redutores, dependendo do nanomaterial almejado.

2.1. Bactérias

A utilização de bactérias para a produção de nanomateriais é facilmente justificada do ponto de vista da sua utilização para síntese verde por serem fontes de compostos baratas, de fácil manutenção e manipulação, e de rápido crescimento. As biomassas desses microrganismos são utilizadas para sintetizar nanomateriais de modo intra ou extracelular. A biossíntese extracelular é considerada um método mais econômico, em que os componentes extracelulares desses microrganismos são utilizados para a produção dos nanomateriais em meios reacionais geralmente aquosos. Já a biossíntese intracelular pode requerer alguns procedimentos adicionais, como a aplicação de detergentes ou tratamentos ultrassônicos para liberação dos nanomateriais sintetizados³². Já foram relatadas reações de síntese utilizando diversas bactérias, como espécies extremófilas, fotoheterotróficas, enterobactérias, dentre outras³²⁻³⁷. Além de bactérias, há relato do uso de outros organismos procariontes, arqueias (Archaea), como fonte de biomoléculas utilizadas na síntese verde de nanomateriais³⁸.

2.2. Fungos

Fungos são organismos microscópicos ou macroscópicos que representam uma alternativa ecoamigável para a síntese de nanomateriais via extra ou intracelular, assim como as bactérias⁷. Esses organismos sintetizam nanomateriais a partir de proteínas, enzimas, peptídeos ou polissacarídeos secretados ou presentes na parede celular^{39,40}. Fungos ascomicetos, como *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum* e *Epicoccum nigrum*⁴⁰⁻⁴²; fungos basidiomicetos, como *Lentinus edodes* e *Calocybe indica*^{43,44}; e as leveduras (fungos unicelulares), como *Saccharomyces cerevisiae* e *Magnusiomyces ingens*^{45,46}, já foram utilizados com sucesso para a síntese de nanopartículas metálicas (NPMs). Ademais, os fungos também são utilizados para síntese de polímeros úteis para produção de nanomateriais, dentre eles a quitosana produzida pelo fungo *Cunninghamella elegans* e a celulose do fungo *Trichoderma reesei*⁴⁷.

2.3. Plantas

As plantas apresentam alto potencial para produção de nanomateriais devido aos processos empregando esses organismos serem, em geral, simples, eficazes e de custos baixos⁴⁸. As reações de síntese podem ser realizadas utilizando o extrato de uma parte da planta (folhas, raízes, frutos, sementes etc.), os óleos vegetais, óleos essenciais ou o próprio organismo^{49,50}. Dessa forma, os componentes do metabolismo das plantas representam uma fonte quase inesgotável de recursos biológicos a serem utilizados para a síntese verde de nanomateriais, como os metabólitos secundários (flavonoides, compostos fenólicos, saponinas, terpenoides, alcaloides, ácido gálico, polióis), as proteínas, as vitaminas, os carboidratos e os lipídeos⁵¹⁻⁵⁵. Dentre as possibilidades de uso na síntese de nanomateriais, os extratos das plantas são amplamente explorados por conterem diversos metabólitos secundários que estão relacionados com a síntese e a estabilização de NPMs^{8-10,22,23,56}. Além disso, óleos vegetais e óleos essenciais oriundos de plantas são utilizados durante diversas rotas de síntese de nanocarreadores poliméricos e lipídicos, bem como para a formação de complexos moleculares em nanoescala⁵⁷.

Uma ampla diversidade de coprodutos, subprodutos e resíduos agrícolas também pode ser utilizada na síntese verde de nanomateriais, por exemplo, cascas de grãos²⁸, cascas de frutas^{58,59} e bagaço de cana-de-açúcar⁶⁰. Além disso, a carboximetilcelulose, polímero modificado derivado da celulose presente na parede celular vegetal, pode ser amplamente utilizada para a síntese de nanopartículas poliméricas (NPPs) e NPMs^{61,62}. Sendo assim, materiais agrícolas e florestais, que são fontes de celulose, podem ser utilizados para a síntese dessas nanopartículas a partir da carboximetilcelulose.

2.4. Algas

Algas formam um grupo de organismos autótrofos unicelulares ou multicelulares encontrados em variados ambientes que apresentam diversos compostos que podem ser utilizados em processos de síntese de nanomateriais. Dentre estas, destacam-se as algas marinhas, que produzem terpenoides, esteroides, polissacarídeos fucoidanos, dentre outros, com potenciais aplicações para a síntese verde de nanomateriais⁶³⁻⁶⁵. As classes de algas com mais representantes utilizados na síntese verde de nanomateriais são as Chlorophyceae e Phaeophyceae, sendo que estas totalizam a maioria dos organismos utilizados⁶⁶. Ademais, o alginato é um biopolímero proveniente de algas marrons que é muito utilizado para o encapsulamento de biomoléculas por apresentar biocompatibilidade alta⁶⁷.

2.5. Animais

Dentre os recursos biológicos provenientes de animais, alguns se destacam na síntese verde de nanomateriais por serem abundantes, biocompatíveis e fáceis de serem processados, como a quitosana, a queratina, o colágeno e a gelatina. A quitosana é um copolímero catiônico composto por glucosamina e N-acetilglucosamina obtido pela N-desacetilação alcalina parcial da quitina, um polissacarídeo naturalmente abundante obtido a partir da carapaça de crustáceos (ex.: camarões, caranguejos), bastante aplicado na formulação de nanomateriais visando ao encapsulamento de princípios ativos por apresentar biocompatibilidade alta, ser biodegradável, atóxico e de

custo baixo^{12-14,68-70}. A queratina é uma proteína estrutural de origem animal encontrada na epiderme e que auxilia na adesão de células epiteliais, e anexos epidérmicos, como pelos, espinhos, escamas e penas⁷¹. Essa proteína tem sido bastante utilizada para a síntese de nanopartículas carreadoras de drogas pela capacidade de responder a diferenças de pH e, por consequência, ter alta especificidade e controle na liberação de compostos^{72,73}. O colágeno é a proteína animal mais abundante, sendo o componente polipeptídico mais importante de tecidos como pele, ossos, tendões e cartilagens. Além de ser um material extremamente versátil, apresenta biocompatibilidade alta, sendo muito empregado na síntese de nanomateriais⁷⁴⁻⁷⁶. A gelatina é um biopolímero obtido por meio da hidrólise alcalina, ácida ou enzimática do colágeno, e, assim como seu precursor, apresenta biocompatibilidade alta⁷⁷ e tem sido utilizada para síntese de nanomateriais adequados para o transporte de fármacos^{78,79} e genes⁸⁰.

2.6. Células eucarióticas e vírus

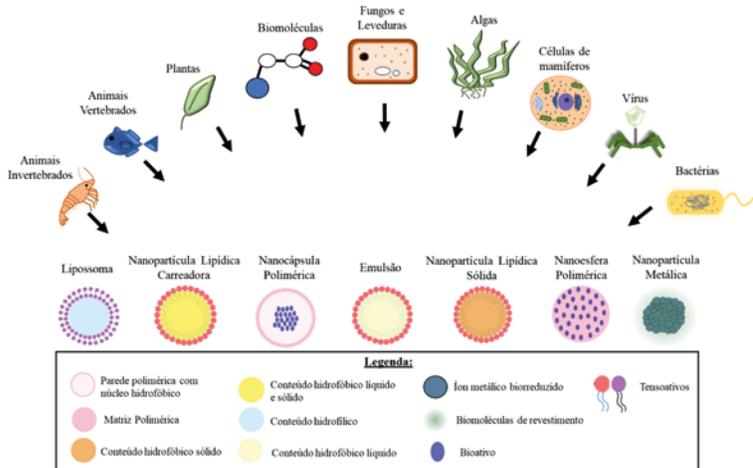
Células de mamíferos isoladas e vírus também podem ser utilizados para a síntese de nanomateriais. Culturas de células de mamíferos humanas saudáveis (célula de rim embrionária) e tumorais (adenocarcinoma cervical - HeLa, carcinoma de fígado humano e adenocarcinoma de mama humano) produziram NPMs no meio intracelular e extracelular⁸¹; e células-tronco mesenquimais humanas transfectadas com gene bacteriano magnetotático foram utilizadas para a síntese de nanopartículas magnéticas⁸². Os vírus, por serem organismos de tamanho nanométrico que infectam células bacterianas, humanas e vegetais, nas quais liberam seu material genético, podem ser utilizados como nanossistemas carreadores de moléculas de interesse e, assim, para entrega de drogas, genes e reagentes de contraste para técnicas de imagem^{83,84}.

2.7. Biomoléculas

Biomoléculas representam uma grande parcela dos recursos biológicos utilizados na síntese verde de nanomateriais. De fato, metabólitos primários e secundários isolados a partir de organismos vivos são considerados reagentes extremamente versáteis para produção de nanomateriais, pois tanto o tamanho, quanto a morfologia e a composição química podem ser finamente ajustados por estratégias de planejamento experimental. Ácidos nucleicos, aminoácidos, carboidratos, proteínas, vitaminas, metabólitos secundários e princípios ativos podem ser isolados de seus organismos originários para serem utilizados como insumos na síntese de NPMs⁸⁵⁻⁸⁷ ou associados a nanocarreadores poliméricos, lipídicos e lipossomais⁸⁸⁻⁹² sendo que, no último caso, ocorre a liberação controlada de moléculas de interesse com a bioatividade desejada. Dentre as diversas biomoléculas utilizadas na síntese de nanomateriais, a lecitina tem tido destaque recente por ser uma mistura de fosfolípideos neutros e polares de origem animal ou vegetal, sendo as lecitinas de ovo e soja as mais empregadas⁹³. Tais moléculas atuam como surfactantes para produção de nanoemulsões e nanopartículas lipídicas (NPLs)⁹⁴⁻⁹⁶.

Alguns dos recursos biológicos comumente utilizados na síntese verde de nanomateriais foram sumarizados na **Figura 1**, juntamente de algumas categorias de nanoestruturas que podem ser produzidas com eles. Além desses, há uma grande diversidade de substâncias e organismos, muitos dos quais produtos, coprodutos, subprodutos e resíduos agropecuários, aquícolas e florestais que já foram estabelecidos como fontes de recursos biológicos para produção de nanomateriais por rotas de síntese verde. Não obstante, quando se observa a grandiosa biodiversidade encontrada na natureza, fica claro que muitas fontes em potencial para a síntese verde de nanomateriais ainda devem ser descobertas, testadas e exploradas de maneira racional, sustentável e equilibrada.

Figura 1. Exemplos representativos de recursos biológicos tipicamente utilizados na síntese verde e alguns tipos de nanomateriais passíveis de serem produzidos com eles



Fonte: elaborada pelos autores.

3. Nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde

Diversos nanomateriais podem ser produzidos utilizando rotas de síntese verde, por exemplo, as nanopartículas metálicas (NPMs), lipídicas (NPLs) e poliméricas (NPPs), emulsões, lipossomos, virossomos, nanofilmes, nanomateriais de carbono, nanofibras, nanocristais, entre outros. Cada categoria de nanomaterial apresenta propriedades específicas de modo a permitir aplicações distintas no que diz respeito aos princípios ativos veiculados ou padrão de organização dos constituintes possibilitado com a nanoestruturação. Nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde oferecem vantagens em relação às prescrições convencionais, incluindo maior eficácia, por meio da liberação progressiva e controlada/sustentada do princípio ativo (ex.: metal, fármaco, cosmético, pesticida, fertilizante, vacina ou hormônio); diminuição da

toxicidade da formulação; meia-vida do ativo aumentada; aumento de estabilidade e diminuição das taxas de decomposição ou degradação do ativo; ausência ou minimização de reações e efeitos colaterais adversos; menor número de aplicações do princípio ativo; potencial para incorporação de moléculas visando ao direcionamento específico a alvos em órgãos, tecidos ou células; e possibilidade de incorporação de substâncias hidrofílicas ou hidrofóbicas. Assim, uma gama ampla de classes de nanomateriais com características muito específicas pode ser desenvolvida por abordagens de síntese verde com vistas a uma grande diversidade de aplicações inovadoras ao mesmo tempo que sustentáveis.

3.1. Nanopartículas metálicas

As nanopartículas metálicas (NPMs) são sistemas nanoestruturados que apresentam características físicas, químicas e/ou biológicas únicas. As NPMs oriundas de processos de síntese verde geralmente são produzidas utilizando recursos biológicos na presença de sais metálicos, resultando em nanomateriais com diferentes composições, formas e tamanhos. A maioria dessas características está intimamente relacionada com a dimensão diminuta quando comparado ao material nas suas formas macroestruturada e molecular^{1,2,8-10,23}. As NPMs podem ser obtidas utilizando diversos tipos de recursos biológicos, como ácidos nucleicos, aminoácidos, peptídeos, proteínas, monossacarídeos, polisacarídeos, vitaminas, bactérias, protozoários, vírus, algas, fungos e plantas. Estes podem atuar na formação e na estabilização das NPMs como agentes redox (redução/oxidação) e de revestimento^{1,2}. Diversos metais podem ser utilizados para a síntese de NPMs por rotas de síntese verde, dentre eles bário, cádmio, cobalto, cobre, ferro, lítio, magnésio, manganês, prata, ouro e zinco. Nessa abordagem de síntese, os componentes biológicos (metabólitos primários e secundários) atuam como agentes para promover a redução química dos íons metálicos (M^+) aos metais na forma neutra (M^0) ou possibilitar a formação de óxidos metálicos ($MxOy$), resultando, após nucleação e crescimento, na formação de NPMs. Além disso, as biomoléculas presentes no meio reacional também podem atuar como agentes estabilizantes

e de revestimento/cobertura de superfície das NPMs, impedindo, ou pelo menos minimizando, os processos de aglomeração ou agregação durante e ao término da síntese⁹⁷.

3.2. Nanopartículas poliméricas

Não obstante as propriedades intrínsecas às suas estruturas metálicas e ainda a possibilidade de apresentar em sua camada de cobertura a presença de moléculas bioativas com possíveis implicações funcionais, em geral, as NPMs não são consideradas carreadores com grande capacidade para o transporte de princípios ativos (excetuando-se os próprios metais). Como sistemas eficientes para o armazenamento e o transporte de ativos, existe uma ampla gama de outros nanomateriais, dentre os quais as nanopartículas poliméricas (NPPs). As NPPs são sistemas nanoestruturados compostos por polímeros e que apresentam dimensões dentro da escala nanométrica. As NPPs podem ser formadas por polímeros sintéticos, semissintéticos, modificados ou naturais, sendo que cada um deles é escolhido com base nas possíveis características desejadas e potenciais aplicações. Dentre os polímeros naturais (biopolímeros) utilizados para síntese verde de NPPs, a albumina, o alginato, a carboximetilcelulose, a quitosana e a gelatina são frequentemente escolhidos em função de características como a solubilidade em água alta, biodegradabilidade, biocompatibilidade, custo baixo e potencial para associação com inúmeros princípios ativos demandados em processos de encapsulamento (nanocápsulas) ou aprisionamento (nanoesferas). Nesse contexto, NPPs de quitosana contendo o peptídeo dermaseptina apresentaram maior atividade contra células HeLa quando comparada à atividade do peptídeo livre¹². Adicionalmente, a quitosana também foi utilizada na formulação de NPPs contendo o peptídeo melitina isolado do veneno de abelhas e um peptídeo direcionador específico visando ao desenvolvimento de um sistema de liberação sustentada *in vitro* de melitina a células tumorais de mama¹⁴. Estratégias semelhantes também foram desenvolvidas para veiculação de outros peptídeos anticânceres em NPPs produzidas à base de quitosana em associação ao copolímero sintético polietileno-glicol^{13,16}.

3.3. Emulsões

O desenvolvimento de nanomateriais por rotas de síntese verde torna-se ainda mais desafiador quando se pretende realizar o encapsulamento ou o aprisionamento de princípios ativos altamente lipossolúveis. Dentre os nanomateriais que podem ser utilizados para veiculação de princípios ativos hidrofóbicos, as nanopartículas lipídicas (NPLs) e, principalmente, as emulsões correspondem a alguns dos nanoveículos mais empregados. Além disso, nanossistemas estruturados com lipídeos, como é o caso das emulsões e também das NPLs, geralmente são considerados menos tóxicos para aplicações *in vivo* do que outros nanomateriais. De fato, como uma parcela expressiva dos princípios ativos úteis na medicina, agricultura, veterinária e indústria como um todo apresenta solubilidade em água baixa, a utilização de nanossistemas lipídicos propicia a inserção de inúmeros compostos nos diversos setores produtivos.

As emulsões podem ser definidas como sistemas compostos por dois líquidos imiscíveis, sendo um deles completamente disperso na forma de glóbulos (fase interna, descontínua ou dispersa) no outro líquido (fase externa, contínua ou dispersante) e normalmente estabilizados por tensoativos, em proporções variadas conforme as características desejadas. As emulsões podem ser do tipo água em óleo (A/O); óleo em água (O/A); água, óleo, água (A/O/A), ou óleo, água, óleo (O/A/O)^{98,99}. De acordo com o tamanho dos glóbulos presentes conforme o método de preparo, as emulsões podem ser classificadas em macroemulsões, microemulsões ou nanoemulsões^{99,100}. Macro, micro e nanoemulsões à base de óleos vegetais e animais têm sido utilizadas extensivamente em farmácia, medicina, cosméticos e indústria alimentícia. Isso porque os lipídeos, constituintes principais dos óleos, além de agentes estruturantes adequados para formação de emulsões, também apresentam diversas atividades biológicas reconhecidas^{16,17,101-104}. Adicionalmente, alguns autores relatam a adição de polissacarídeos naturais às formulações visando a um aumento na longevidade da emulsão. Recentemente, microemulsões constituídas por óleo de rã e quitosana apresentaram atividade contra células de melanoma murino (B16F10)¹⁶,

representando o potencial desse tipo de nanomaterial produzido por rota de síntese verde para aplicações biomédicas.

3.4. Nanopartículas lipídicas

Dentre os carreadores lipídicos nanoestruturados, nos últimos anos, as nanopartículas lipídicas sólidas (NPLSs) e nanopartículas lipídicas carreadoras (NPLCs) foram as que mais se destacaram pelo fato de apresentarem propriedades diferenciadas dos sistemas carreadores convencionais, tais como emulsões tradicionais. As NPLSs são partículas compostas por lipídeos que estão em fase sólida à temperatura ambiente, e surfactantes são utilizados para emulsificação¹⁰⁵. Consequentemente, a solidificação da fase lipídica aumenta a retenção e a estabilidade dos compostos ativos aprisionados e reduz processos de difusão molecular em comparação às situações nas quais estão dispersos em óleos líquidos de emulsões convencionais, favorecendo o aumento do tempo de meia-vida e, consequentemente, a liberação sustentada. Já as NPLCs são constituídas por lipídeos na fase líquida (óleos) e sólida (gorduras) que resultam em nanomateriais com propriedades de encapsulamento/aprisionamento e liberação de ativos ainda mais controlados devido ao maior grau de imperfeição cristalina¹⁰⁶. Assim, a mistura de lipídeos sólidos e líquidos induz a uma redução na faixa de temperatura de fusão, comparado com a do lipídeo sólido isolado, contudo, mantendo as nanoestruturas sólidas à temperatura ambiente e possibilitando um armazenamento eficiente dos princípios ativos.

3.5. Lipossomas

Outra classe de nanomateriais para entrega de ativos que podem armazenar e veicular compostos com propriedades físico-químicas diversas é aquela formada pelos lipossomos ou lipossomas. Os lipossomas são vesículas esféricas consideradas biologicamente inertes e biocompatíveis constituídas por uma (unilamelares) ou várias bicamadas lipídicas concêntricas (multilamelares) que isolam um ou vários compartimentos aquosos internos do meio externo e os quais podem ser utilizados para transportar compostos hidrofóbicos ou hidrofílicos. Lipossomas podem

ser produzidos por diferentes métodos, dentre eles extrusão, ultrassonicação, homogeneização por alta pressão e microfluídica¹⁰⁷. Os lipídeos utilizados na síntese de lipossomas podem ser de origem sintética ou natural, sendo que os naturais podem ser comumente extraídos a partir de tecidos, células ou fluidos biológicos utilizando solventes orgânicos. Fosfolipídeos extraídos de membranas de hemácias já foram utilizados como matéria-prima para formulação de lipossomas¹⁵. Além disso, os lipossomas foram utilizados como veículos carreadores de peptídeos obtidos a partir da hemoglobina, e esses nanomateriais foram capazes de reduzir expressivamente a viabilidade de células de câncer de mama murino *in vitro*¹⁵.

3.6. Capsídeos virais e virossomas

A capacidade que os vírus apresentam de invadir e infectar células específicas tem sido utilizada para o desenvolvimento de alguns nanomateriais que visam à entrega de princípios ativos no interior das células. O uso de estruturas virais para transportar ativos de interesse constitui uma das abordagens com maior seletividade e especificidade dentre as várias possibilidades de nanomateriais que podem ser produzidos por síntese verde. Outras formas de utilizar vírus na produção de nanomateriais compreendem sínteses de nanopartículas e nanobastões utilizando proteínas do vírus do mosaico do tabaco¹⁰⁸ e de *quantum dots* (pontos quânticos) monodispersos utilizando bacteriófago¹⁰⁹.

3.7. Nanofilmes

Os nanofilmes são filmes estruturados em nanoescala com vistas ao ganho de propriedades novas pelo incremento na razão entre a área de superfície e o volume possibilitado pela organização nanométrica, e acarretando propriedades adicionais àquelas preexistentes. De fato, as características biológicas, elétricas, ópticas, magnéticas ou eletroquímicas de tais nanomateriais apresentam sensibilidade alta quando expostas às pequenas perturbações envolvendo alterações químicas, físicas ou biológicas. Assim, o arranjo estrutural de nanofilmes é crucial para determinar o desempenho de um dispositivo ou sistema baseado nesses novos nanomateriais. Nesse sentido, muita

atenção tem sido dada para a produção de nanofilmes contendo pelo menos um recurso biológico, particularmente visando ao desenvolvimento de nanocatalisadores enzimáticos²⁷, nanobiossensores²³ e outras superfícies funcionais²⁰.

3.8. Nanomateriais de carbono

Os nanomateriais de carbono estão entre os mais fascinantes e, ao mesmo tempo, controversos nanomateriais. Isso porque há resultados bastante contraditórios quanto aos efeitos, sobretudo biológicos, desses nanomateriais. Algumas rotas de síntese verde têm sido propostas para produção de nanomateriais de carbono¹¹⁰⁻¹¹². A expectativa é a de que a utilização de rotas e solventes ecoamigáveis poderá contribuir com a minimização e quem sabe atenuação de alguns efeitos adversos e resistência ao uso desses nanomateriais já que, em geral, durante a produção em rotas convencionais, há utilização de solventes e reagentes que geram resíduos potencialmente tóxicos.

3.9. Nanocristais

Os nanocristais constituem uma classe de nanomateriais que podem ser formados por hidrólise branda de biopolímeros como a celulose e permitindo, com isso, a produção de estruturas apresentando domínios cristalinos com expressivo aumento na razão área de superfície/volume promovido pela nanoestruturação²⁸. Cascas e palhas de produtos agrícolas já foram utilizadas com sucesso para produção de nanocristais de celulose, os quais se mostraram eficientes na remoção de metais pesados e sódio de água²⁸.

3.10. Nanofibras

As nanofibras representam outro nanomaterial amplamente utilizado e cuja produção se inspira nos arranjos de organização estrutural da natureza como aqueles presentes nas proteínas formadoras de fibras em teias de aranhas e cujo desempenho mecânico é comparável ao aço do ponto de vista de resistência e ao nylon do ponto de vista de elasticidade^{113,114}. De fato, esses biomateriais únicos têm inspirado o desenvolvimento de nanofibras com propriedades inovadoras e amplas aplicabilidades¹¹⁵.

4. Técnicas para caracterização de nanomateriais produzidos por síntese verde

O ato de caracterizar relaciona-se a destacar, diferenciar, distinguir ou mensurar as particularidades de algum material em qualquer escala e dimensão. Nas situações em que se avalia um material na escala *bulk*, fica relativamente fácil imaginar algumas técnicas de caracterização. Para determinar o tamanho (ex.: comprimento, largura, altura) de um objeto, pode-se utilizar uma régua, uma trena ou um paquímetro; para medir a massa, podem-se utilizar balanças; e assim diversas ferramentas comumente disponíveis podem ser empregadas para avaliação de outras características físicas e químicas de um material em escala macroscópica. Outro nível de dificuldade ocorre nas situações em que é necessário caracterizar as propriedades físico-químicas e estruturais de um material em escala nanométrica. Nesse caso, as características mais comumente avaliadas são: tamanho, forma, carga, composição, estrutura e quantidade. Como existem particularidades em cada nanomaterial (ex.: metálico, polimérico, lipídico, emulsões, lipossomas, etc.), para elucidação de cada uma dessas características existem mais de uma técnica disponível para avaliação, muitas vezes oferecendo informações complementares.

A chamada nanometrologia constitui um ramo da ciência das medições (metrologia) que visa ao aferimento das medidas em nanoescala. Atualmente, diferentes técnicas são utilizadas visando à obtenção de informações importantes relacionadas às propriedades de nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde. Assim, o emprego de ferramentas de nanometrologia possibilita avaliar a composição elementar, estrutura, tamanho, forma, carga, dispersão, estados de agregação e/ou aglomeração, entre outros. A **Tabela 1** indica algumas das possíveis ferramentas e quais características podem ser medidas. A maioria das técnicas utilizadas na caracterização de um nanomaterial produzido por síntese química também pode ser aplicada para

investigar os nanomateriais oriundos das rotas de síntese verde, mas há alguns detalhes metodológicos, como tempo de estabilização, número de leituras, tempo de aquisição e outros parâmetros, que, se ajustados, podem facilitar e até mesmo possibilitar a caracterização de nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde. Muitas dessas possíveis modificações, quando necessárias, serão expostas ao longo dos subtópicos abaixo, em que também são apresentadas as principais técnicas utilizadas em trabalhos disponíveis na literatura de acordo com as respectivas características que se pretendem avaliar no nanomaterial com cada uma delas.

Tabela 1 - Principais técnicas utilizadas para caracterização de nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde

Técnica	Sigla	Tamanho (T)	Forma (F)	Carga (Cr)	Composição (C)	Estrutura (E)	Quantidade (Q)
Análise de adsorção/dessorção	BET	•					
Análise elementar	AE				•		
Análise termogravimétrica	TGA				•	•	
Calorimetria exploratória diferencial	DSC				•		
Cromatografia gasosa	GC						•
Cromatografia líquida de alta eficiência	HPLC						•
Difração de raios X	DRX				•	•	
Espalhamento de luz dinâmico	DLS	•					
Espectrometria de absorção atômica	EAA				•		
Espectrometria de massa	MS				•		
Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X	EFX				•	•	
Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier	FTIR				•	•	
Espectroscopia de ressonância paramagnética	EPR				•	•	
Espectroscopia Raman	RAMAN				•	•	
Espectroscopia UV-visível	UV-Vis				•	•	
Fracionamento por campo e fluxo	FCF			•			
Microscopia de força atômica	MFA	•	•				
Microscopia eletrônica de transmissão	MET	•	•				
Microscopia eletrônica de varredura	MEV	•	•				
Potencial Zeta de superfície	ZETA			•			
Ressonância magnética nuclear	RMN				•	•	

4.1. Tamanho e Forma

O tamanho é uma característica mensurável em um nano-objeto cujo completo entendimento somente é possível mediante a definição da informação a que se refere já que pode estar relacionado a medidas em 1D (ex.: comprimento, largura, altura, diâmetro, raio, perímetro), 2D (ex.: área, área de superfície) ou 3D (ex.: volume). Além disso, o tamanho de uma nanoestrutura pode ser fortemente influenciado pelo meio circundante a ela (ex.: hidrodinâmico ou seco), características intrínsecas a cada técnica (ex.: utilização de luz, elétrons, sonda) e também condições de preparo (ex.: nativas ou processadas). Enquanto as medidas de tamanho estão diretamente relacionadas com a acurácia e a precisão da técnica escolhida, a forma é uma característica passível de interpretação individual que implica um certo grau de subjetividade por parte do examinador, apesar da possibilidade de utilização de descritores matemáticos para aferir formas.

Há diversas técnicas disponíveis para avaliação do tamanho e da forma de nanomateriais sintetizados por rotas de síntese verde. Na escolha da(s) técnica(s), deve-se considerar a categoria de nanomaterial, o estado em que se encontra e as possíveis particularidades, de cada material, que podem influenciar na aquisição dos dados. Também se deve observar a possibilidade de que mais de uma técnica pode ser necessária para avaliar um nanomaterial devido à particularidade de informações disponibilizadas por cada uma. Além disso, resultados provenientes de outras técnicas e metodologias que também contribuem com a avaliação do nanomaterial devem ser interpretados à luz dos dados obtidos de tamanho e forma. Para a caracterização de tamanho (T) e forma (F) de nanomateriais obtidos por rotas de síntese verde (**Tabela 1**), geralmente são utilizadas técnicas como: microscopia eletrônica de varredura e de transmissão (MEV e MET, respectivamente; avaliam T e F), microscopia de força atômica (MFA; avalia T e F), espalhamento de luz dinâmico (DLS; avalia T) e análise de adsorção/dessorção (BET; avalia T de poros).

4.1.1. Microscopia eletrônica

MEV e MET são técnicas de microscopia eletrônica amplamente utilizadas na caracterização nanoestrutural, avaliando a interação de um feixe de elétrons incidente com a amostra. As duas técnicas permitem obter informações qualitativas e quantitativas de nanomateriais, como a morfologia e a distribuição do diâmetro seco, respectivamente. Na MEV, os elétrons envolvidos com a formação das imagens são os secundários e retroespalhados, e esse tipo de interação possibilita a aquisição de imagens com aparência tridimensional relacionada à morfologia das superfícies dos materiais analisados, sendo possível visualizar o tamanho e a forma dos nanomateriais. Nanopartículas metálicas^{116,117}, poliméricas¹¹⁸, nanopartículas de prata (AgNPs) e ouro (AuNPs) estabilizadas com alginato de cálcio¹¹⁹, nanoemulsões¹²⁰ e lipossomos¹²¹ são alguns tipos de nanomateriais que podem ser caracterizados. Para nanomateriais metálicos, em geral, é necessário apenas que a amostra esteja seca e depositada em um suporte condutor para sua visualização. Já nanomateriais não metálicos, comumente necessitam passar por processamentos adicionais, incluindo processos de desidratação e de secagem ao ponto crítico, em que as amostras são secas utilizando temperatura e pressão controladas até uma condição na qual o CO₂ líquido se torna gasoso, preservando a nanoestrutura. Em seguida, os nanomateriais não metálicos são submetidos a um processo de metalização em que são recobertos por uma camada delgada de metal condutor, por exemplo, o ouro, para poderem ser visualizados ao microscópio.

Já a MET é uma técnica que utiliza elétrons espalhados elasticamente, inelasticamente e transmitidos para formação da imagem bidimensional do nanomaterial conforme a densidade eletrônica. A MET é uma das técnicas mais utilizadas para avaliar o tamanho e a forma de nanomateriais sintetizados por síntese verde, além da avaliação de ultraestruturas celulares após interação com nanomateriais. O preparo das amostras para essa técnica também depende do tipo de nanomaterial investigado. Nanomateriais mais eletrodensos como NPMs são facilmente identificados em imagens¹²², mas diversos outros nanoma-

teriais podem ser visualizados, como os poliméricos¹²³, poliméricos com membranas celulares¹²⁴, nanocompósitos metálico-poliméricos^{125,126} e até *carbon dots*¹¹¹, após utilizar agentes de contraste nos nanomateriais em investigação. A principal desvantagem dessas duas técnicas de microscopia é a necessidade de alto vácuo porque este pode dificultar, ou até mesmo inviabilizar, a caracterização de determinados nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde.

4.1.2. Microscopia de força atômica

A MFA é uma técnica que consiste em percorrer a superfície topográfica de uma amostra, em contato ou não, utilizando uma sonda (ponteira). As imagens obtidas durante as análises são resultantes do processamento computacional das forças resultantes medidas (atrativas e/ou repulsivas) a partir da interação entre os átomos da sonda e da amostra. As imagens com resolução atômica são formadas por meio da deflexão de uma haste (*cantilever*) integrada com a sonda, resultando em informações de topografia do material analisado, além de propriedades como rugosidade, atrito, viscoelasticidade e outras; fornecendo informações adicionais sobre as propriedades mecânicas e físicas dos nanomateriais. Sendo assim, a MFA pode ser utilizada para obtenção de informações sobre tamanho e forma, mas também de outras propriedades mecanoestruturais de nanomateriais. Além disso, as análises em geral também não requerem preparação complexa de amostra, possibilitando até mesmo investigar eventos dinâmicos e cinéticos em condições muito próximas às nativas, minimizando possíveis alterações na amostra. Diferentes tipos de nanomateriais podem ser analisados por MFA, tais como NPMs¹⁰, NPPs¹³, nanofolhas¹²⁷ e nanoemulsões¹²⁸.

4.1.3. Espalhamento de luz dinâmico

A técnica de espalhamento de luz dinâmico (DLS - do inglês, *dynamic light scattering*), também conhecida como espectroscopia de correlação de fótons (fotocorrelação), possibilita mensurar o diâmetro hidrodinâmico (médio e distribuição em classes) baseado no espalhamento do feixe de luz (laser) gerado pelo movimento browniano de estruturas particuladas dispersas em uma suspensão coloidal, permitindo a

determinação de tamanhos tipicamente na faixa de 0,3 nm - 10 μm ¹²⁹. A análise realizada por DLS é não destrutiva, sendo amplamente aceita para a caracterização de nanomateriais obtidos por rotas de síntese verde^{8,10,15,16,130,131}, apesar de ser menos utilizada do que deveria considerando os benefícios de tais análises sob o ponto de vista da compreensão do nanomaterial. Diversos nanomateriais dispersos em solução podem ser avaliados por essa técnica, sejam metálicos^{8,10,132}, poliméricos^{13,123,133}, lipossomas^{11,130}, entre outros nanomateriais que em suspensão não alteram sua morfologia. Adicionalmente, análises por DLS permitem avaliar o índice de polidispersividade (PDI), que é um parâmetro indicativo da homogeneidade de suspensões coloidais o qual varia de 0 a 1; assim, suspensões que exibem valores mais próximos de 0 são classificadas como monodispersas (homogêneas) e as que apresentam valores mais próximos de 1 são classificadas como polidispersas (heterogêneas). O PDI tem sido amplamente utilizado para avaliar o grau de homogeneidade de suspensões coloidais de nanomateriais obtidas por abordagens de síntese verde. É preciso atentar para o comportamento do nanomaterial em suspensão e observar se ao longo das leituras feitas pelo equipamento os valores mensurados variam muito. Isso pode indicar instabilidade da camada de estabilização adquirida no processo de síntese verde do nanomaterial ou formas variadas.

4.1.4. Adsorção/Dessorção - BET

A técnica de BET (letras iniciais dos autores Brunauer, Emmett e Teller), também conhecida por teoria de adsorção multimolecular, é baseada na adsorção e na dessorção de um gás inerte - geralmente nitrogênio - em multicamadas na superfície de materiais sólidos. A partir dessa técnica, é possível medir a área superficial específica e o tamanho de poros. Em abordagens na nanotecnologia verde, essa técnica pode ser empregada na caracterização de nanoesferas de carbono¹³⁴, em nanocatalisadores^{135,136} e até em hidrogéis e aerogéis contendo nanomateriais^{137,138}.

4.2. Carga

As propriedades elétricas (cargas) consistem em uma das características físicas mais importantes de nanomateriais produzidos por síntese verde. A carga é rotineiramente utilizada como parte dos critérios envolvidos no controle de qualidade. Isso porque indica de maneira indireta a estabilidade coloidal do nanossistema. Assim, propriedades elétricas relacionadas à carga de superfície de nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde devem ser determinadas quando é necessário avaliar a estabilidade coloidal do sistema, e também quando os nanomateriais produzidos podem interagir com outros materiais, em que a carga auxilia no entendimento de possíveis mecanismos de ação e interações (**Tabela 1**).

4.2.1. Potencial Zeta de superfície

Algumas das propriedades elétricas de um nanomaterial podem ser medidas utilizando técnicas como o potencial Zeta de superfície (ZETA). ZETA é uma técnica de caracterização extremamente relevante para nanomateriais sintetizados por rotas de síntese verde, bem como de soluções contendo metabólitos primários e secundários oriundos de recursos biológicos potencialmente aplicáveis na síntese verde. O ZETA mede propriedades elétricas de superfície e é calculado a partir da medição da velocidade na qual as partículas migram em direção a um eletrodo após a aplicação de um campo elétrico, sendo por isso também denominado mobilidade eletroforética. Além disso, o ZETA é um parâmetro indicativo de estabilidade coloidal, assim, nanomateriais que exibem valores de ZETA maiores que +30 mV ou menores que -30 mV são considerados estáveis, sendo que a estabilidade pode ser classificada como moderada (± 30 a ± 40 mV), boa (± 40 a ± 60 mV) e excelente (menor que -60 mV ou maior que +60 mV), enquanto aqueles que apresentam valores inferiores a 30 mV em módulo apresentam tendência à instabilidade incipiente, coagulação rápida ou até mesmo floculação (0 a ± 5 mV)¹³⁹. Diversos tipos de nanomateriais obtidos por rotas de síntese verde podem ser analisados quanto à carga, dentre eles NPMs^{140,141}, NPPs^{12,14,124}, NPLs¹⁴² e emulsões^{16,17}.

4.2.2. Fracionamento por Campo e Fluxo

A técnica de fracionamento por campo e fluxo (FCF) está ganhando popularidade como ferramenta para caracterização de nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde em função de possibilitar a separação de nanopartículas por tamanho e carga. Entretanto, ainda é considerada uma técnica relativamente pouco utilizada em nanotecnologia verde e também de forma geral. A separação das nanopartículas ocorre em função de como são afetadas por um campo externo aplicado na amostra¹⁴³. Portanto, é uma técnica de separação, em que é aplicado um campo em uma suspensão ou solução inserida em um pequeno canal com determinado fluxo. No caso da avaliação da carga de nanopartículas, o campo aplicado é o elétrico, separando então os nanomateriais em função de suas mobilidades diferenciais.

4.3. Composição e estrutura

A composição, assim como os arranjos estruturais (ex.: padrões cristalinos, padrões amorfos), está diretamente relacionada com a reatividade e a dissolubilidade de um determinado nanomaterial, sendo, portanto, etapas cruciais durante a caracterização. Além disso, o reconhecimento de certas características e padrões pode possibilitar rastreabilidade química, algo tipicamente almejado em inúmeras aplicações. Existem algumas técnicas já bem preestabelecidas para serem utilizadas visando à avaliação da composição (C) e/ou estrutura (E) de nanomateriais de uma maneira geral, incluindo aqueles produzidos por rotas de síntese verde (**Tabela 1**), como a análise elementar (AE; avalia C), análise termogravimétrica (TGA; avalia C e E), calorimetria exploratória diferencial (DSC; avalia C), espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR; avalia C e E), espectrometria de absorção atômica (EAA; avalia C), espectrometria de massa (EM; avalia C), espectroscopia Raman (RAMAN; avalia C e E), ressonância magnética nuclear (RMN; avalia C e E), espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (EFX; avalia C e E), Espectroscopia UV-Visível (UV-Vis; avalia C e E), difração de raios X (DRX; avalia C e E) e espectroscopia de ressonância paramagnética (ERP; avalia C e E).

4.3.1. Análise elementar

Análise elementar (AE) é a designação comum atribuída a um conjunto de técnicas que permitem determinar a composição e a proporção dos elementos presentes em uma amostra de maneira qualitativa ou quantitativa, conforme o caso. Particularmente, a AE-CHN é uma técnica que determina as porcentagens de carbono (C), nitrogênio (N) e hidrogênio (H) presentes em uma amostra, e para isso, o material deve ser carbonizado em uma atmosfera de oxigênio puro, e os gases liberados pela amostra são analisados em um detector de condutividade térmica. Para essas análises, as amostras podem estar em estado líquido ou sólido, facilitando assim sua aplicação a diferentes tipos de nanomateriais. Esse método de caracterização pode ser utilizado para nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde como NPPs¹⁴⁴, NPMs^{145,146} e nanossais¹⁴⁷. Essa técnica não exige nenhuma variação de metodologia específica para avaliação de nanomateriais obtidos por rotas de síntese verde.

4.3.2. Análise termogravimétrica

Termogravimetria ou análise termogravimétrica (TGA - do inglês, *thermogravimetric analysis* ou *thermal gravimetric analysis*) é uma técnica que permite avaliar a variação de massa em função da variação de temperatura que se aplica no sistema. Seu princípio de operação consiste em avaliar a perda (ex.: decomposição, desidratação, combustão) ou ganho (ex.: oxidação) de massa em função de uma programação controlada de temperatura ou tempo, e para tal essa técnica deve ser realizada em atmosfera controlada e pode estar acoplada a outras técnicas, como FTIR ou MS. Dependendo da atmosfera utilizada, podem-se obter respostas diferentes, sendo que em atmosfera inerte comumente se identificam defeitos estruturais, ligantes da amostra e estabilidade; e já em atmosfera oxidante identificam-se pureza, massa residual e reatividade à atmosfera ambiente. A nanotecnologia utiliza essa metodologia para caracterizar micelas, nanomateriais de carbono, nanopartículas de todos os tipos e outros nanomateriais que tenham certa porosidade. Já para nanomateriais obtidos por rotas de síntese verde, o uso de AT foi relatado para investigar NPMs¹⁴⁸⁻¹⁵⁰, nanocompósitos

de grafeno e quitosana¹⁵¹, e nanossais¹⁴⁷. Em geral, nesses casos, as análises visam averiguar a estabilidade térmica, não necessitando de variação de metodologia para avaliação de nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde.

4.3.3. Calorimetria exploratória diferencial

A calorimetria exploratória diferencial (DSC - do inglês, *differential scanning calorimetry*) também é uma das análises térmicas, sendo que nesse caso a técnica possibilita a medição da transferência de calor para a amostra de nanomaterial e proporciona um aquecimento homogêneo na superfície do material, sendo que esse aquecimento altera- no interior do nanomaterial dependendo da simetria. Existem dois tipos de transferência de calor: fluxo de calor e compensação de potência. Na do primeiro tipo, tanto a amostra como a referência são aquecidas e termopares avaliam o calor específico, entropia e variação de temperatura; já no do segundo tipo, a amostra e a referência são aquecidas separadamente e a potência tenta equilibrar a temperatura entre a amostra e a referência. Na nanotecnologia verde, essa análise é utilizada para avaliar a estabilidade térmica e decomposição de nanopartículas¹⁵⁰ e também a capacidade de reversão ao calor¹⁵².

4.3.4. Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) permite a identificação de grupos funcionais presentes em moléculas por meio de alterações específicas nos níveis de energia vibracional e rotacional das ligações químicas após a excitação em um comprimento de onda específico¹⁵³. Assim, fornece evidências da presença de possíveis grupos funcionais na estrutura do nanomaterial obtido por meio de síntese verde, podendo contribuir para sua identificação, sendo que para tal se faz necessário pesquisar por espectros semelhantes na literatura ou comparar com padrões disponíveis em bases de dados. Essa técnica pode ser utilizada na nanotecnologia verde para caracterização de NPMs, a fim de verificar a sua composição¹²⁶, assim como averiguar quais são os possíveis componentes do mate-

rial biológico que estão atuando como agentes de revestimento e/ou estabilização^{10,154,155}. Na caracterização das NPPs, análises por FTIR podem ser utilizadas para constatar se houve o revestimento ou a impregnação de um novo composto¹⁵⁶, e também pode ser utilizada na avaliação de nanofilmes, a fim de fornecer informações acerca da composição¹⁵⁷ e sobre o mecanismo de interação entre um composto de interesse e os nanofilmes¹⁵⁸.

4.3.5. Espectrometria de absorção atômica

A espectroscopia de absorção atômica (EAA) determina quantitativa-mente ou qualitativamente a presença de metais, semimetais e alguns não metais em uma amostra de nanomaterial. O princípio que essa técnica se baseia é o de medir a intensidade da absorção de radiação eletromagnética. Essa radiação é advinda de uma fonte de radiação primária de átomos no estado fundamental. A técnica permite a análise de amostras de nanomateriais em estado líquido, sólido ou gasoso. Na área de nanotecnologia verde, essa técnica vem sendo utilizada para quantificar a possível presença de elementos químicos¹⁵⁹ e até mesmo para averiguar a estabilidade de nanomateriais¹⁶⁰.

4.3.6. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa (MS - do inglês, *mass spectrometry*) é uma técnica analítica em que moléculas presentes em uma amostra são ionizadas em fase gasosa e separadas de acordo com a sua razão massa (m) sobre carga (z) - m/z , sendo que a massa molecular é expressa em massa atômica ou Dalton (Da), equivalente à duodécima parte da massa de um átomo de carbono-12. Os principais componentes de um espectrômetro de massa são a fonte de ionização, o analisador de massa e o detector. No analisador de massa, os íons são separados em baixa pressão de acordo com a relação m/z , e um sistema de processamento gera o espectro de massa representado graficamente pela intensidade arbitrária do íon (eixo y) em relação à razão m/z (eixo x). A partir da relação m/z , é possível identificar biomoléculas, analisar o grau de pureza destas, elucidar estruturas moleculares, analisar modificações estruturais, entre outros¹⁶¹. Nesse

contexto, diferentes métodos de espectrometria de massa podem ser utilizados para caracterizar a estrutura química presente em nanomateriais obtidos por meio de rotas de síntese verde. Dentre eles, a espectrometria de massa por ionização e dessorção a laser assistida por matriz e analisador por tempo de voo (MALDI-TOF - do inglês *matrix assisted laser desorption ionization time of flight*)^{8,162} e a espectrometria de massa por plasma acoplado indutivamente (ICP - do inglês, *inductively coupled plasma*)¹⁶³ são provavelmente os mais utilizados em nanotecnologia. A nanotecnologia atua principalmente fornecendo nanomateriais enquanto insumos que oferecem vantagens técnicas¹⁶⁴. O uso de nanomembranas com resposta termomecânica oferece potencial para melhorar a sensibilidade na análise de massa de íons com alta massa molecular, e em misturas complexas de proteínas¹⁶⁵ o uso de nanolíquidos (amostra aquosa com a presença de nanomateriais suspensos) pode aumentar a sensibilidade do método já que há a diminuição de volumes mortos e a possibilidade de vazamentos em comparação com a técnica sem a presença desses nanomateriais¹⁶⁶⁻¹⁶⁹, e a utilização de *nano-electrospray* permite conectar cada emissor a uma separação individual do sistema, devido à ausência de um movimento mecânico. Assim, o rendimento de detecção por MS pode ser aumentado drasticamente^{170,171}.

4.3.7. Espectroscopia Raman

A espectroscopia Raman (RAMAN) é uma técnica analítica com uma série de vantagens em relação a outras técnicas que permitem avaliar a composição ou mais especificamente o ambiente químico de nanomateriais, incluindo a não destruição da amostra, ser rápida, eficiente e de fácil manipulação. Essa técnica baseia-se no princípio do espalhamento inelástico da luz que incide sobre qualquer material, resultando em mudanças específicas nos níveis de energia que correspondem a impressões digitais ou assinaturas específicas das moléculas¹⁷². A RAMAN é utilizada para identificar ou investigar compostos presentes em nanomateriais obtidos por rotas de síntese verde, como nanocompósitos constituídos por polianilina, carboximetilcelulose e nanotubos de carbono¹⁷³ e NPMs^{174,175}. Com essa técnica, consegue-se também

diferenciar nanoestruturas produzidas do mesmo elemento químico, de acordo com a morfologia¹⁷⁶. No ramo sustentável da nanotecnologia, a RAMAN pode ser utilizada de duas maneiras, caracterizando em si um nanomaterial produzido utilizando um recurso biológico¹⁷⁷ ou nanoestruturado naturalmente¹⁷⁸; ou mesmo utilizando o próprio nanomaterial para acentuar o sinal da técnica e caracterizar outros materiais como drogas ilícitas¹⁷⁹. Esse melhoramento da técnica de RAMAN se chama espalhamento Raman amplificado em superfície (SERS), em que o nanomaterial produzido é depositado na superfície na qual a amostra será depositada, e este acentua a sensibilidade e diminui o limite de detecção, tornando geralmente os sinais mais definidos¹⁷⁹.

4.3.8. Ressonância magnética nuclear

A ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das ferramentas com maior poder de resolução visando à determinação de estruturas orgânicas, as quais são exploradas por meio da propriedade magnética de núcleos atômicos. O campo magnético do núcleo poderá alinhar (ou não) com o campo externo, e, assim, o fóton emitido com a quantidade de energia correta poderá inverter o estado de spin da molécula, fazendo com que no espectro sejam detectados sinais (picos) cuja altura de cada um indica a quantidade relativa de cada estrutura orgânica, e o número de picos indica o modo segundo o qual elas estão organizadas. As principais aplicações dessa técnica em nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde são para identificar ou indicar a presença de um composto orgânico no nanomaterial¹⁴⁷.

4.3.9. Espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X

A espectroscopia de fotoelétrons excitados por raios X (EFX) permite identificar os elementos químicos presentes na superfície de uma amostra, determinar suas abundâncias relativas e até mesmo inferir sobre a morfologia dessa superfície. O princípio da técnica é basicamente incidir raios X sobre a superfície da amostra e coletar os fotoelétrons emitidos em um detector. Nanocompósitos de manganês dopado com bário, magnésio, alumínio e oxigênio^{180,181}, nanocristais (nanopartículas cristalinas)¹⁸² e NPMs^{174,183} todos sintetizados por rotas sustentáveis já foram caracterizados por essa técnica.

4.3.10. Espectroscopia UV-Visível

A espectroscopia na região do UV-Visível (UV-Vis) é uma técnica simples, rápida e sensível comumente aplicada na caracterização das propriedades ópticas e na quantificação de nanomateriais. O princípio dessa técnica baseia-se na incidência de luz em determinado comprimento de onda nas regiões do espectro UV ou Visível e captação em um detector de quanto a amostra transmitiu ou então absorveu da luz incidente. UV-Vis tem sido utilizada para monitorar reações de síntese verde, avaliar a estabilidade e propriedades ópticas de nanopartículas de ouro (AuNPs) e prata (AgNPs); e, além disso, possibilita a detecção da banda típica de ressonância plasmônica de superfície (SPR) provocada apenas quando esses metais estão nanoestruturados^{10,184,185}. O efeito SPR consiste na oscilação coletiva de elétrons livres, criando uma densidade de carga na superfície do nanomaterial sob influência da radiação eletromagnética em um comprimento de onda específico, resultando em uma banda de absorção característica. Com essa técnica, AgNPs foram identificadas de acordo com a estruturação de suas arestas^{186,187}, e NPMs foram identificadas de acordo com o seu metal formador^{188,189}.

4.3.11. Difração de raios X

A técnica de difração de raios X (DRX) possibilita a determinação da possível presença de estruturas cristalinas em nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde. Como o próprio nome já indica, a técnica baseia-se na incidência de raios X na amostra, em vários ângulos diferentes, e posteriormente os raios difratados são capturados. Esse tipo de onda eletromagnética tem comprimento de onda menor do que a luz visível, fazendo com que as leituras em espectro ofereçam respostas de acordo com o elemento químico presente e também a ordenação dos átomos distribuídos no espaço. Em nanometrologia, essa técnica pode ser aplicada para identificação de fases^{155,190} e para obtenção do tamanho de nanomateriais^{191,192}.

4.3.12. Espectroscopia de ressonância paramagnética

A espectroscopia de ressonância paramagnética (EPR - do inglês, *electron paramagnetic resonance*) ou ressonância de spin eletrônico é utilizada quando há moléculas com configuração eletrônica de valência incompleta, elétrons desemparelhados (material paramagnético). Essas moléculas podem ser compostos orgânicos, inorgânicos, metais de transição, entre outros. Essa espectroscopia funciona semelhante à RMN, entretanto, havendo a excitação de spin de elétrons em vez de spin de núcleos. A principal aplicação dessa técnica em nanomateriais produzidos por rota de síntese verde é identificar ou indicar a presença de um composto no nanomaterial^{180,193,194}. Pode-se perceber que há várias metodologias e equipamentos passíveis de serem aplicados para averiguar a composição e a estrutura de nanomateriais sintetizados por rota verde. O que deve definir qual nanometrologia será utilizada é: composição, estado físico, quantidade da amostra e compatibilidade do nanomaterial ao instrumento. Existem técnicas mais completas e caras, assim como técnicas simples e baratas. Assim, por vezes, pode ser inviável utilizar muitas técnicas que indicam informações similares para caracterizar um nanomaterial a não ser que tenha um propósito específico para cada uma.

4.4. Quantidade

Enquanto a quantificação direta e absoluta, por exemplo, do número de nanopartículas presentes em uma suspensão ainda representa um desafio atual em nanotecnologia, muitas técnicas descritas no tópico 4.3 mencionaram quantificação, porém a maioria das vezes essa quantificação era relativa aos demais componentes presentes na amostra ou avaliada de maneira indireta. A fim de obter a quantificação real, é necessário acoplar técnicas de cromatografia àquelas apresentadas no tópico anterior (**Tabela 1**). As técnicas de cromatografia permitem particionar ou fracionar os componentes presentes na amostra de um nanomaterial antes de haver a quantificação. A determinação da quantidade é uma característica importante em nanotecnologia verde, sendo que, apesar de não ser comumente utilizada para quantificar os nanomateriais produzidos em si (ex.: determinar o número de partículas

em suspensão), oferece resultados importantes para o entendimento da particularidade do ativo impregnado, produtos de reação, constituintes estruturais, entre outros.

4.4.1. Cromatografia gasosa

O principal objetivo da cromatografia gasosa (GC – do inglês, *gas chromatography*) é particionar os componentes de uma amostra entre a fase móvel (gasosa) e a fase estacionária (líquida ou sólida). Muitas vezes, essa técnica é utilizada de maneira conjunta com abordagens de MS. Esse acoplamento é relativamente simples e combina os benefícios das duas técnicas: a GC oferece a alta seletividade e eficiência de separação enquanto com a MS obtém a informação estrutural e a massa molecular, melhorando a seletividade¹⁹⁵. Na nanometrologia, essa técnica, geralmente, não é empregada diretamente no estudo de nanomateriais, mas para detecção de compostos que nem sempre são conhecidos, e serão utilizados na síntese verde¹⁹⁶, e também para tornar a GC mais sensível com combinação de uma técnica de microextração em fase sólida utilizando NPMs para detectar traços de contaminantes em amostras ambientais¹⁹⁷.

4.4.2. Cromatografia líquida de alta eficiência

Já a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC - do inglês, *high performance liquid chromatography*) é responsável por separar compostos químicos que estão em solução, com a fase móvel sendo um solvente líquido. Na nanotecnologia verde, geralmente, não é utilizada diretamente no nanomaterial e sim para complementar a análise deste. Essa técnica é utilizada para averiguar a quantidade de ativo residual que não foi incorporado por nanocompósitos absorventes de nanopartículas de ferro¹⁹⁸, caracterizar produtos de reação que foram catalisados por NPMs¹⁹⁹ e analisar nanopigmentos produzidos por fitoplânctons²⁰⁰.

Com base no exposto neste tópico, percebe-se que existem várias técnicas de nanometrologia que possibilitam mensurar as principais características de um determinado nanomaterial. Essas técnicas são de extrema importância, principalmente para avaliação de nanomate-

riais produzidos por síntese verde, devido a alguns dos desafios relacionados com esta área, como a recorrente reprodutibilidade baixa. O uso de algumas dessas técnicas se faz necessário para monitorar o nanomaterial resultante de cada nova síntese e também para monitorar a estabilidade das propriedades ao longo do tempo, se assim for necessário. Utilizar das técnicas de forma lógica e intencional é a forma de obter resultados plausíveis de tamanho, forma, carga, composição, estrutura e quantidade de nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde.

5. Desafios atuais e perspectivas para o uso de nanomateriais obtidos por síntese verde

Um dos principais desafios atuais encontrados nas abordagens realizadas em nanotecnologia verde para produção de nanomateriais diz respeito à reprodutibilidade dos processos, particularmente aqueles envolvendo recursos biológicos obtidos diretamente da natureza ou das cadeias produtivas. Considerando que os metabólitos primários e secundários presentes em organismos ou extratos de suas partes são alguns dos principais agentes utilizados para a síntese verde de muitos nanomateriais, caso a composição e/ou as concentrações dos metabólitos sejam diferentes entre dois lotes, podem ser formadas nanoestruturas com características físicas, químicas e até mesmo biológicas bastante distintas. Talvez o exemplo mais marcante seja devido à diversidade de perfis fitoquímicos encontrados em plantas expostas a diferentes condições.

De fato, diversos são os fatores bióticos e abióticos que podem acarretar alterações no metabolismo das plantas e outros organismos, dentre eles a pressão ambiental constante, incluindo o estresse hídrico²⁰¹, a falta ou excesso de nutrientes essenciais²⁰¹, mudanças no pH do solo ou outros ambientes²⁰², ataques de herbívoros patógenos e parasitas²⁰³, competição entre espécies²⁰⁴, o excesso ou a falta de exposição

à luz^{205,206} e a pressão antrópica acidental (por exemplo, poluição) e intencional (por exemplo, o uso de herbicidas e pesticidas), além da ação antrópica direta (por exemplo, desmatamentos). Em resposta a esses estímulos, alterações no metabolismo podem propiciar condições para a sobrevivência melhores²⁰². Sendo assim, a produção de metabólitos pode ser regulada de acordo com o estímulo ao qual o organismo é submetido²⁰⁷ e muitas vezes isso se torna preponderante com vistas ao entendimento e controle do processo de formação de nanomateriais por rotas de síntese verde.

Além disso, a idade de um órgão ou tecido (por exemplo, em plantas, folhas jovens ou senescentes) também pode influenciar na concentração e na presença de metabólitos. O fundo genético do material biológico é outro fator que deve ser considerado durante a seleção de uma espécie, mas tem sido absolutamente negligenciado pela maioria dos pesquisadores durante o desenvolvimento das rotas de síntese verde de nanomateriais. Todo esse cenário da fisiologia de um determinado organismo pode acarretar a produção de extratos com uma composição final diferente de metabólitos, e, conseqüentemente, acarretando propriedades distintas dos nanomateriais finais.

Outro aspecto também relacionado diz respeito aos cuidados e à atenção com a estação do ano e indicadores climáticos da época em que o material biológico é coletado como condições essenciais visando à reprodutibilidade das rotas de síntese²². A maioria dos estudos não relata em que período do ano o material vegetal foi coletado, nem mesmo descreve as condições de crescimento e cultivo das plantas (ou qualquer outro organismo), ou até mesmo sequer qualifica e quantifica os principais metabólitos presentes nos extratos e biomoléculas utilizados na síntese verde. Essas informações devem ser consideradas essenciais para a reprodutibilidade dos processos e para compreender os mecanismos que resultam na formação de nanomateriais. Por esses motivos, estudos futuros deverão envolver comparações entre materiais coletados em diferentes condições e épocas do ano, além do fato que esforços precisam ser empreendidos quanto à utilização

de plantas ou outros organismos obtidos de cultivos *in vitro*, *indoor*, em casa de vegetação e, sobretudo, aqueles recursos biológicos com bagagem genética bem estabelecida a serem obtidos e utilizados a partir de bancos ativos de germoplasma.

A busca por estratégias que confirmam previsibilidade (preditibilidade) na formação e atividade biológica de nanomateriais constitui outro desafio e uma tendência em nanotecnologia verde²⁰⁸. Uma opção é a realização de uma avaliação sistemática de diferentes recursos biológicos visando identificar aqueles que apresentam alto potencial para serem utilizados na produção de nanossistemas, por meio da caracterização física, química e biológica das estruturas produzidas, bem como do material biológico utilizado (determinação qualitativa e quantitativa da composição química), e compilar essas informações em bases de dados. Então, esses dados seriam aplicáveis para o desenvolvimento de nanossimuladores baseados em modelagem matemática visando à predição de fatores críticos que influenciam o processo de síntese verde e também a sua aplicabilidade.

Outro aspecto que deve ser considerado durante o planejamento experimental de processos baseados em síntese verde é que a utilização biomédica ou industrial de nanomateriais em larga escala requer o desenvolvimento de estratégias aprimoradas e ajuste de parâmetros para a produção escalonada. Nessa etapa da pesquisa e desenvolvimento, são realizados os estudos de escalonamento piloto que atendam a demandas específicas e que requerem algumas etapas cruciais envolvendo o detalhamento de estimativas de custo de produção e conseqüentemente a avaliação dos investimentos necessários, assim como possíveis impactos e riscos, de modo a assegurar a produção rápida, segura e eficiente de um determinado nanoproduto. Até o presente momento, há poucos relatos acerca de processos de escalonamento de rotas de síntese verde de nanomateriais, mas a perspectiva é de que um número crescente de iniciativas e tecnologias estará nos próximos anos alcançando os setores produtivos.

Além do desenvolvimento das rotas de síntese visando à obtenção de nanomateriais em escala para as mais diversas aplicações tecnológicas, atualmente têm sido discutidos formas e mecanismos para dissolver ou eliminar os nanomateriais produzidos, visto que há possibilidade de que o descarte indevido, seja ele intencional ou acidental, possa acarretar riscos e até mesmo danos ambientais e para saúde²⁰⁹. Essa preocupação é provavelmente menor em relação aos nanomateriais biodegradáveis como NPPs, lipossomas e emulsões, e também quando se leva em conta abordagens em nanotecnologia verde que por si já tendem a ser ecoamigáveis. De todo modo, principalmente em relação às NPMs, como as AgNPs, mesmo nos casos em que as rotas escolhidas são baseadas em síntese verde, existe a necessidade de se buscarem alternativas para evitar o descarte indevido desses materiais no ambiente. De fato, atualmente, tem-se ampliado às preocupações relacionadas aos potenciais riscos associados às AgNPs quando em contato com sistemas biológicos, visto que um dos mecanismos de atuação desses nanomateriais se dá por meio dos processos de oxidação e consequente liberação de íons Ag^+ . Assim, com o aumento de volume de produção de AgNPs para inúmeros produtos, como têxteis, cosméticos e embalagens, surge a necessidade de desenvolvimento de rotas eficientes para a dissolução desses nanomateriais. Dessa forma, alguns estudos recentes têm mostrado o potencial de dissolução de AgNPs por meio da utilização de agentes oxidantes, como ácido acético²⁰⁹, ácido cítrico¹⁰¹, cloreto de sódio²³, cloro²¹⁰ e peróxido de hidrogênio²¹¹.

Nos últimos anos, levando-se em conta o crescente aumento do interesse no desenvolvimento e aplicações de nanomateriais, surge um novo campo de pesquisa em nanotecnologia, denominado nanotoxicologia, cujo foco principal é o de avaliar as interações entre os nanomateriais com os três domínios de seres vivos e o meio ambiente^{212,213}. Mais recentemente, e tendo em vista as questões regulatórias envolvidas com a utilização de novos materiais de base nanotecnológica, o termo nanosseguurança surgiu de modo mais abrangente²¹⁴. Nesse contexto, a nanosseguurança é vista como parte integrante do desenvolvimento

de qualquer novo produto ou processo em nanotecnologia (incluindo processos de síntese verde), consistindo em um campo multidisciplinar e *multi-stakeholder* (com múltiplas partes interessadas).

Assim, há necessidade de criação de um marco regulatório para o uso seguro e sustentável de nanomateriais, incluindo aqueles produzidos por abordagens de síntese verde. Essa necessidade está relacionada com a potencial minimização da exposição dos pesquisadores, trabalhadores e consumidores, bem como do meio ambiente, frente aos nanomateriais que podem ser promotores de algum risco à saúde humana ou ao meio ambiente. Algumas etapas podem ser consideradas como essenciais no processo de compreensão dessas questões de nanosseguurança. Em primeiro lugar, é necessário conhecer detalhadamente as propriedades físico-químicas do nanomaterial (por exemplo, tamanho e distribuição de tamanho, forma, carga, composição química, potencial para a aglomeração/agregação, cristalinidade, mecanismos de solubilidade/dissolução, densidade, estabilidade, porosidade e área de superfície). Em segundo, é necessário definir a aplicabilidade do nanomaterial e discernir os nanomateriais voltados para aplicações biológicas e biomédicas daqueles que serão utilizados para aplicações em outros setores, como eletrônicos. Em terceiro, é necessário determinar o(s) mecanismo(s) de interação entre os nanomateriais e sistemas vivos em nível molecular, celular, tecidual e sistêmico (nanotoxicidade), e nos níveis de ecossistemas (nanoecotoxicidade) por meio de ensaios *in silico*, *in vitro*, *in situ* e *in vivo* tanto relacionados à exposição aos organismos-alvos quanto também organismos não alvos dos nanomateriais produzidos por rotas de síntese verde.

Adicionalmente, apesar do crescente interesse do setor produtivo no uso de nanomateriais, poucas são as abordagens verdadeiramente em consonância com questões de sustentabilidade dos produtos e processos desenvolvidos, sobretudo empregando rotas de produção baseadas em síntese verde. Entretanto, algumas iniciativas recentes têm apresentado inovações nesse quesito enquanto visam apresentar soluções na busca por um futuro do uso de nanotecnologias verdes. Um

exemplo é a *startup* NanoDiversity (<https://nanodiversity.com.br>), cuja missão é “produzir nanossistemas multifuncionais, de forma segura e ecoamigável, fornecendo produtos adequados às necessidades de seus clientes e contribuindo para o seu desenvolvimento científico e tecnológico”. Essa empresa tem desenvolvido toda uma gama de novos nanomateriais que perpassam por inúmeros setores, mas cuja ênfase é na nanossustentabilidade.

Outro aspecto muito importante no que diz respeito à nanotecnologia verde é a possível redução de custos dos processos como um benefício do uso de recursos biológicos para a nanoestruturação. Uma representante desse cenário é a iniciativa NanoFarm (<https://www.facebook.com/nanofarmbsb/>), apresentada durante a Campus Party Brasília 2018, e que tem como premissa a geração de nanomateriais sustentáveis utilizando resíduos domésticos como a borra de café e aplicando em equipamentos para síntese verde eletrodomésticos, e assim permitindo a geração de produtos que visam ao aumento da fertilidade de solos utilizados em hortas urbanas e em prol da agricultura familiar e da sustentabilidade ambiental.

Por fim, a nanotecnologia verde também oferece oportunidades no que tange à geração de novos conceitos relacionados ao uso de nanomateriais, já que propriedades novas emergem do uso de recursos biológicos nos processos de produção de nanomateriais²¹⁵⁻²²⁴. Um exemplo marcante de aplicações em bioengenharia é o caso da iniciativa NanoBioFabLab (<https://www.facebook.com/nanobiofablab/>), que se relaciona a um novo conceito em pesquisa, desenvolvimento e inovação (PD&I) focado na biofabricação 3D utilizando nanomateriais como blocos essenciais para construção de biomiméticos. Assim, o objetivo dessa iniciativa é explorar as possibilidades da fabricação digital para formar estruturas multifuncionais e adaptativas personalizadas contendo nanomateriais inteligentes obtidos por meio de rotas sustentáveis. Inúmeras possíveis aplicações nos mais variados setores e áreas, incluindo a bioengenharia de tecidos, agricultura, veterinária, indústria farmacêutica e de cosméticos, indústria alimentícia e até mesmo o setor aeroespacial.

Com base no exposto ao longo deste capítulo, as estratégias de síntese verde de nanomateriais apresentam alto potencial para o desenvolvimento de soluções inovadoras e sustentáveis visando a aplicações de novos materiais em nanoescala nos mais variados setores. Há perspectivas e expectativas para um crescente engajamento por parte de pesquisadores, estudantes e empreendedores interessados em desenvolver projetos de PD&I nas mais diferentes áreas que busquem superar os desafios atuais e futuros no intuito de consolidar e fortalecer essa vertente da nanotecnologia que busca na natureza o delicado equilíbrio entre as soluções inovadoras e as sustentáveis.

6. Referências

1. SILVA, Luciano P.; REIS, Ivy G.; BONATTO, Cíntia C. Green Synthesis of Metal Nanoparticles by Plants: Current Trends and Challenges. In: Vladimir A. Basiuk; Elena V Basiuk. (Org.). **Green Processes for Nanotechnology**. 1 ed., v. 4. Springer, Cham, 2015, cap. XI, p. 259-275. DOI: 10.1007/978-3-319-15461-9_9.
2. SILVA, Luciano P. et al. Nanotecnologia verde para síntese de nanopartículas metálicas. In: RESENDE, Rodrigo Ribeiro. **Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria**. 1 ed. v. 4. São Paulo: Blucher, 2017, cap. 26, p. 967-1012. DOI 10.5151/9788521211150-26.
3. JOANITTI, Graziella A.; SILVA, Luciano P. The emerging potential of by-products as platforms for drug delivery systems. **Current Drug Targets**, v. 15, n. 5, p.478-485, abr. 2014. DOI: 10.2174/13894501113149990171.
4. FIGOVSKY, Oleg; BEILIN, Dmitry (Ed.). **Green Nanotechnology**. United States: Pan Stanford, 2017. 538 p.
5. SILVA, Luciano P.; JOANITTI, Graziella A. By-Products as scaffolds for drug delivery systems. **Current Drug Targets**, v. 15, n. 5, p. 477-477, abr. 2014. DOI: 10.2174/138945011505140404150213.
6. GRIGGS, David et al. Sustainable development goals for people and planet. **Nature**, v. 495, n. 7441, p. 305-307, mar. 2013. DOI: 10.1038/495305a.
7. SILVA, Luciano P.; BONATTO, Cíntia C.; POLEZ, Vera. L. P. Green synthesis of metal nanoparticles by fungi: current trends and challenges. In: Ram Prasad. (Org.). **Advances and Applications Through Fungal Nanobiotechnology**. 1ed. Alemanha: Springer, 2016, v. 1, p. 71-89.

8. BONATTO, Cíntia C.; SILVA, Luciano P. Higher temperatures speed up the growth and control the size and optoelectrical properties of silver nanoparticles greenly synthesized by cashew nutshells. **Industrial Crops And Products**, v. 58, p. 46-54, jul. 2014. DOI: 10.1016/j.indcrop.2014.04.007.

9. BONATTO, Cíntia Caetano. **Desenvolvimento e avaliação de atividades biológicas *in vitro* e *in vivo* de micro- e nanopartículas de prata utilizando plantas do Cerrado**. Tese. 2016.(Doutorado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2016.

10. SILVEIRA, Ariane P. et al. Physicochemical characteristics and antibacterial effects of silver nanoparticles produced using the aqueous extract of *Ilex paraguariensis*. **Materials Chemistry and Physics**, v. 216, p. 476-484, 2018. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.05.068.

11. BONATTO, Cíntia Caetano. **Miméticos de hemácias como sistemas de liberação de hidrolisados de hemoglobina com atividades antitumorais *in vitro***. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

12. MEDEIROS, Kelliane A.; JOANITTI, Graziella A.; SILVA, Luciano P. Chitosan nanoparticles for dermaseptin peptide delivery toward tumor cells *in vitro*. **Anti-Cancer Drugs**, v. 25, n. 3, p. 323-331, mar. 2014. DOI: 10.1097/CAD.000000000000052.

13. MEDEIROS, Kelliane Almeida. **Desenvolvimento de nanopartículas de quitosana contendo o peptídeo citolítico melitina para o tratamento *in vitro* e *in vivo* de células tumorais de mama**. 2015. 170 f., il. Tese (Doutorado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2015.

14. MEDEIROS, Kelliane A.; SILVA, Luciano P. Chitosan particles associated with targeting peptide for melittin release towards breast cancer cells *in vitro*. **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, v. 16, n. 12, p. 12792-12797, 1 dez. 2016. DOI: 10.1166/jnn.2016.12819.
15. BONATTO, Cinthia C.; JOANITTI, Graziella A.; SILVA, Luciano P. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150020694, título: “Processo de obtenção de moléculas bioativas em sistemas carreadores micro e nanoestruturados”, Instituição de registro: **INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial**, Depósito: 29/01/2015.
16. BONATTO, Cinthia C.; JOANITTI, Graziella A.; SILVA, Luciano P. *In vitro* cytotoxic activity of chitosan-bullfrog oil microemulsion against melanoma cells. **IET Nanobiotechnology**, v. 9, n. 4, p. 172-177, 1 ago. 2015. DOI: 10.1049/iet-nbt.2014.0010.
17. VIOL, Livia Cristina de Souza. **Desenvolvimento de formulações contendo SRPIN340 e seus análogos e prospecção de bioatividades**. 2017. Tese (Doutorado em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, 2017.
18. ABREU, Aryana Dias. **Desenvolvimento de nanopartículas poliméricas à base de quitosana para liberação sustentada de hormônios adeno-hipofisários e avaliação de seus efeitos in vitro na reprodução animal**. 2014. 114 f., il. Dissertação (Mestrado em nanociência e Nanobiotecnologia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
19. SEKHON, Bhupinder S. Nanotechnology in agri-food production: an overview. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 7, p. 31, 2014. DOI: 10.2147/NSA.S39406.
20. LU, Yuan; OZCAN, Soydan. Green nanomaterials: On track for a sustainable future. **Nano Today**, v. 10, n. 4, p. 417-420, 2015. DOI: 10.1016/j.nantod.2015.04.010.

21. BARBOSA, Eduardo F. et al. Protein characterisation of *Brosimum gaudichaudii* Trécul latex and study of nanostructured latex film formation. **IET Nanobiotechnology**, v. 8, n. 4, p. 222-229, 1 dez. 2014. DOI: 10.1049/jiet-nbt.2013.0042.
22. SILVA, Alessandra Barreto. **Síntese e caracterização de nanoemulsão de óleo de canola e nanopartículas de quitosana contendo acetato de retinol para serem veiculadas por película comestível elaborada pela combinação de biopolímeros para revestimento de frutas**. 2015. 95 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2015.
23. ALBERNAZ, Vanessa Lima. **Síntese verde de nanopartículas de prata com extrato aquoso de folhas de *Brosimum gaudichaudii*, caracterização fisicoquímica, morfológica e suas aplicações no desenvolvimento de um nanobiossensor eletroquímico**. 2014. 121 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
24. VISHWAKARMA, Kanchan et al. **Potential Applications and Avenues of Nanotechnology in Sustainable Agriculture**. In: Nanomaterials in Plants, Algae, and Microorganisms. Academic Press, 2018. p. 473-500. DOI: 10.1016/B978-0-12-811487-2.00021-9.
25. NANODIVERSITY. **NANODIVERSITY**. 2017. Disponível em: <<http://nanodiversity.com.br>>. Acesso em: 11 ago. 2018.
26. SILVA, Luciane Dias. **Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira)**. 2014. 101 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

27. BARBOSA, Eduardo Fernandes. **Prospecção e análises de superfícies para imobilização de biomoléculas**. 2014. Tese (Doutorado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2014.
28. ALBERNAZ, Vanessa L. et al. Cellulose nanocrystals obtained from rice by-products and their binding potential to metallic ions. **Journal of Nanomaterials (Print)**, v. 2015, p. 1-8, set. 2015. DOI: 10.1155/2015/357384.
29. BARROS, Rodrigo Meneses. **Emprego de nanomateriais para análise multi-informacional de impressões digitais latentes**. 2019. Tese (Doutorado em Nanociência e Nanobiotecnologia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2019.
30. NASROLLAHZADEH, Mahmoud et al. **Biological Sources Used in Green Nanotechnology**. In: Interface Science and Technology. Elsevier, 2019. p. 81-111. DOI: 10.1016/B978-0-12-813586-0.00003-1.
31. SILVA, Luciano Paulino. **Current Trends and Challenges in Biofabrication Using Biomaterials and Nanomaterials: Future Perspectives for 3D/4D Bioprinting**. In: Mohammed Maniruzzaman. (Org.). 3D and 4D Printing in Biomedical Applications. 1ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2018, p. 373-421. DOI: 10.1002/9783527813704.ch15.
32. DELJOU, Ali; GOUDARZI, Samad. Green extracellular synthesis of the silver nanoparticles using thermophilic *Bacillus* sp. AZ1 and its antimicrobial activity against several human pathogenetic bacteria. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 14, n. 2, p. 25-32, jun. 2016. DOI: 10.15171/ijb.1259.
33. BAI, Hong-Juan et al. Green synthesis of silver nanoparticles using *Rhodobacter sphaeroides*. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 2723-2728, 6 mai. 2011. DOI: 10.1007/s11274-011-0747-x.

34. MANIVASAGAN, Panchanathan et al. Biosynthesis, antimicrobial and cytotoxic effect of silver nanoparticles using a novel *Nocardiosis* sp. MBRC-1. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 287638, p. 1-9, 20 jun. 2013. DOI: 10.1155/2013/287638.
35. SRIVASTAVA, Nishant; MUKHOPADHYAY, Mausumi. Biosynthesis of SnO₂ nanoparticles using bacterium *Erwinia herbicola* and their photocatalytic activity for degradation of dyes. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 53, n. 36, p. 13971-13979, 22 ago. 2014. DOI: 10.1021/ie5020052.
36. JAVANI, Siamak et al. Four psychrophilic bacteria from Antarctica extracellularly biosynthesize at low temperature highly stable silver nanoparticles with outstanding antimicrobial activity. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 483, p. 60-69, 20 out. 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2015.07.028.
37. SINGH, Priyanka et al. *Weissella oryzae* DC6-facilitated green synthesis of silver nanoparticles and their antimicrobial potential. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 6, p. 1569-1575, 27 jul. 2016. DOI: 10.3109/21691401.2015.1064937.
38. SANTOS, Rossana Calegari. **Otimização da produção de carotenoides e síntese de nanopartículas de prata utilizando a *Archaea Halorubrum saccharovorum***. 2016. Tese. (Doutorado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2016.
39. MUKHERJEE, Priyabrata et al. Fungus-mediated synthesis of silver nanoparticles and their immobilization in the mycelial matrix: a novel biological approach to nanoparticle synthesis. **Nano Letters**, v. 1, n. 10, p. 515-519, 30 ago. 2001. DOI: 10.1021/nl0155274.

40. DURÁN, Nelson et al. Mechanistic aspects of biosynthesis of silver nanoparticles by several *Fusarium oxysporum* strains. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 3, n. 8, p. 2-7, 13 jul. 2005. DOI: 10.1186/1477-3155-3-8.
41. LI, Guangquan et al. Fungus-mediated green synthesis of silver nanoparticles using *Aspergillus terreus*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 1, p. 466-476, 29 dez. 2012. DOI: 10.3390/ijms13010466
42. QIAN, Yongqing et al. Biosynthesis of silver nanoparticles by the endophytic fungus *Epicoccum nigrum* and their activity against pathogenic fungi. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 36, n. 11, p. 1613-1619, 6 mar. 2013. DOI: 10.1007/s00449-013-0937-z.
43. VETCHINKINA, Elena P. et al. Enzymatic formation of gold nanoparticles by submerged culture of the basidiomycete *Lentinus edodes*. **Journal of Biotechnology**, v. 182, p. 37-45, 20 jul 2014. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2014.04.018.
44. GURUNATHAN, Sangiliyandi et al. Comparative assessment of the apoptotic potential of silver nanoparticles synthesized by *Bacillus tequilensis* and *Calocybe indica* in MDA-MB-231 human breast cancer cells: targeting p53 for anticancer therapy. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 4203-4222, 29 jun. 2015. DOI: 10.2147/IJN.S83953
45. KORBKANDI, Hassan et al. Biosynthesis of silver nanoparticles using *Saccharomyces cerevisiae*. **Artificial cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 44, n. 1, p. 235-239, 7 ago. 2016. DOI: 10.3109/21691401.2014.937870.

46. ZHANG, Xuwang et al. Biogenic synthesis of gold nanoparticles by yeast *Magnusiomyces ingens* LH-F1 for catalytic reduction of nitrophenols. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 497, p. 280-285, 20 maio 2016. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2016.02.033.
47. ALSHARARI, Sultan F.; TAYEL, Ahmed A.; MOUSSA, Shaaban H. Soil emendation with nano-fungal chitosan for heavy metals biosorption. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 8130, n. 18, p. 32403-32406, 17 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.103.
48. SINGH, Priyanka et al. Biological synthesis of nanoparticles from plants and microorganisms. **Trends in Biotechnology**, v. 34, n. 7, p. 588-599, 01 jul. 2016. DOI: 10.1016/j.tibtech.2016.02.006.
49. KUMAR, Vineet; YADAV, Sudesh K. Plant-mediated synthesis of silver and gold nanoparticles and their applications. **Journal of Chemical Technology & Biotechnology**, v. 84, n. 2, p. 151-157, fev. 2009. DOI: 10.1002/jctb.2023.
50. BAJERSKI, Lisiane et al. The use of Brazilian vegetable oils in nanoemulsions: an update on preparation and biological applications. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 52, n. 3, p. 347-363, jul/set. 2016. DOI: 10.1590/s1984-82502016000300001.
51. AVERINA, Elena S. et al. Nanostructured lipid carriers (NLC) on the basis of Siberian pine (*Pinus sibirica*) seed oil. **Die Pharmazie - An International Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 65, n. 1, p. 25-31, jan. 2010. DOI: 10.1691/ph.2010.9203.
52. WANG, Shu et al. Application of nanotechnology in improving bioavailability and bioactivity of diet-derived phytochemicals. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 25, n. 4, p. 363-376, abr. 2014. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2013.10.002.

53. LI, Wan et al. Enhanced bioavailability of tripterine through lipid nanoparticles using broccoli-derived lipids as a carrier material. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 495, n. 2, p. 948-955, 30 nov. 2015. DOI:10.1016/j.ijpharm.2015.10.011.
54. RAJESHKUMAR, S.; BHARATH, L.V. Mechanism of plant-mediated synthesis of silver nanoparticles-a review on biomolecules involved, characterisation and antibacterial activity. **Chemico-biological interactions**, v. 273, p. 219-227, ago. 2017. DOI: 10.1016/j.cbi.2017.06.019.
55. OVAIS, Muhammad et al. Role of plant phytochemicals and microbial enzymes in biosynthesis of metallic nanoparticles. **Applied Microbiology and Biotechnology**, p. 1-16, 07 jun. 2018. DOI: 10.1007/s00253-018-9146-7.
56. MITTAL, Amit K.; CHISTI, Yusuf; BANERJEE, Uttam C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346-356, 2013. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.01.003.
57. BILIA, Anna R. et al. Essential oils loaded in nanosystems: a developing strategy for a successful therapeutic approach. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-14, 29 mai. 2014. DOI: 10.1155/2014/651593.
58. HASHTJIN, Adel M.; ABBASI, Soleiman. Nano-emulsification of orange peel essential oil using sonication and native gums. **Food Hydrocolloids**, v. 44, p. 40-48, fev. 2015. DOI: 10.1016/j.carbpol.2010.06.020.
59. ANNU. Shakeel A. et al. Fruit waste (peel) as bio-reductant to synthesize silver nanoparticles with antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 16, n. 3, p. 221-231, ago. 2018. DOI: 10.1016/j.jab.2018.02.002.

60. KUMAR, Anuj et al. Characterization of cellulose nanocrystals produced by acid-hydrolysis from sugarcane bagasse as agro-waste. **Journal of Materials Physics and Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2014. DOI: 10.12691/jmpc-2-1-1.
61. HEBEISH, Ali A. et al. Carboxymethyl cellulose for green synthesis and stabilization of silver nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, n. 3, p. 933-941, 15 out. 2010. DOI:10.1016/j.carbpol.2010.06.020.
62. VEDULA, Venkata B. et al. Preparation and characterization of nanoparticles of carboxymethyl cellulose acetate butyrate containing acyclovir. **Applied Nanoscience**, v. 6, n. 2, p. 197-208, fev. 2016. DOI: 10.1007/s13204-015-0421-y.
63. YOUSEFZADI, Morteza; RAHIMI, Zohreh; GHAFORI, Vahid. The green synthesis, characterization and antimicrobial activities of silver nanoparticles synthesized from green alga *Enteromorpha flexuosa* (wulfen) J. Agardh. **Materials Letters**, v. 137, p. 1-4, 15 dec. 2014. DOI: 10.1016/j.matlet.2014.08.110.
64. LI, Lei; ZHANG, Zunju. Biosynthesis of gold nanoparticles using green alga *Pithophora oedogonia* with their electrochemical performance for determining carbendazim in soil. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 11, p. 4550-4559, 4 maio 2016. DOI: 10.20964/2016.06.13.
65. GONZÁLEZ-BALLESTEROS, Noelia et al. Green synthesis of gold nanoparticles using brown algae *Cystoseira baccata*: Its activity in colon cancer cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 153, p. 190-198, maio 2017. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2017.02.020.
66. SHARMA, Aishwarye et al. Algae as crucial organisms in advancing nanotechnology: a systematic review. **Journal of Applied Phycology**, v. 28, n. 3, p. 1759-1774, 5 nov. 2016. DOI: 10.1007/s10811-015-0715-1.

67. GHIDONI, Ilaria et al. Alginate cell encapsulation: new advances in reproduction and cartilage regenerative medicine. **Cytotechnology**, v. 58, n. 1, p. 49-56, set. 2008. DOI: 10.1007/s10616-008-9161-0.
68. AMIDI, Maryam et al. Chitosan-based delivery systems for protein therapeutics and antigens. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, n. 1, p. 59-82, 31 jan. 2010. DOI: 10.1016/j.addr.2009.11.009.
69. KOPPOLU, Bhanu P. et al. Controlling chitosan-based encapsulation for protein and vaccine delivery. **Biomaterials**, v. 35, n. 14, p. 4382-4389, maio 2014. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.078.
70. HUANG, Ting et al. Chitosan-DNA nanoparticles enhanced the immunogenicity of multivalent DNA vaccination on mice against *Trueperella pyogenes* infection. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 16, n. 8, p. 1-15, 29 jan. 2018. DOI: 10.1186/s12951-018-0337-2.
71. ROUSE, Jullian G.; VAN DYKE, Mark E. A review of keratin-based biomaterials for biomedical applications. **Materials**, v. 3, n. 2, p. 999-1014, 3 fev. 2010. DOI: 10.3390/ma3020999.
72. LI, Yanmei et al. Preparation and characterization of DOX loaded keratin nanoparticles for pH/GSH dual responsive release. **Materials Science and Engineering: C**, v. 73, p. 189-197, 1 abr. 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2016.12.067.
73. SUN, Zhe et al. Tumor-targeted and nitric oxide-generated nanogels of keratin and hyaluronan for enhanced cancer therapy. **Nanoscale**, v. 10, n. 25, p. 12109-12122, 12 jun. 2018. DOI: 10.1039/C8NR03265C.
74. FONSECA, Maria J.; ALSINA, Maria A.; REIG, Francesca. Coating liposomes with collagen (Mr 50 000) increases uptake into liver. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1279, n. 2, p. 259-265, 13 mar. 1996. DOI: 10.1016/0005-2736(95)00265-0.

75. NAGARAJAN, Usharani et al. Fabrication of solid collagen nanoparticles using electrospray deposition. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 5, p. 422-428, 2014. DOI: 10.1248/cpb.c13-01004.
76. UNSER, Sarah et al. Collagen-Gold nanoparticle conjugates for versatile biosensing. **Sensors**, v. 17, n. 2, p. 1-11, 15 fev. 2017. DOI: 10.3390/s17020378.
77. GOU, Yi et al. Bio-inspired protein-based nanoformulations for cancer theranostics. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, p.421-440, 27 abr. 2018. DOI: 10.3389/fphar.2018.00421.
78. BAJPAI, Anil K.; CHOUBEY, Jyoti. Design of gelatin nanoparticles as swelling controlled delivery system for chloroquine phosphate. **Journal of Materials Science: Materials in Medicine**, v. 17, n. 4, p. 345-358, abr. 2006. DOI: 10.1007/s10856-006-8235-9.
79. YASMIN, Rehana et al. Gelatin nanoparticles: A potential candidate for medical applications. **Nanotechnology Reviews**, v. 6, n. 2, p. 191-207, 26 nov. 2017. DOI: 10.1515/ntrev-2016-0009.
80. SABET, Salwa et al. Gelatin nanoparticles enhance delivery of hepatitis C virus recombinant NS2 gene. **PloS one**, v. 12, n. 7, p. 1-15, 26 jul. 2017. DOI: 10.1371/journal.pone.0181723.
81. EL SAID, Waleed A. et al. Synthesis of metal nanoparticles inside living human cells based on the intracellular formation process. **Advanced Materials**, v. 26, n. 6, p. 910-918, 16 dec. 2014. DOI: 10.1002/adma.201303699.
82. ELFICK, Alistair et al. Biosynthesis of magnetic nanoparticles by human mesenchymal stem cells following transfection with the magnetotactic bacterial gene mms6. **Scientific Reports**, v. 7, p. 1-8, 4 jan. 2017. DOI: 10.1038/srep39755.

83. KOUDELKA, Kristopher J. et al. Virus-based nanoparticles as versatile nanomachines. **Annual Review of Virology**, v. 2, n. 1, p. 379-401, 25 set. 2015. DOI: 10.1146/annurev-virology-100114-055141
84. ALEMZADEH, Effat et al. Plant virus nanoparticles: Novel and robust nanocarriers for drug delivery and imaging. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 167, p. 20-27, 1 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.colsurfb, 2018.03.026.
85. NADAGOUDA, Mallikarjuna N.; VARMA, Rajender S. A greener synthesis of core (Fe, Cu)-shell (Au, Pt, Pd, and Ag) nanocrystals using aqueous vitamin C. **Crystal Growth and Design**, v. 7, n. 12, p. 2582-2587, dez. 2007. DOI: 10.1021/cg070554e.
86. LU, Wensheng et al. Green synthesis and characterization of superparamagnetic Fe₃O₄ nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 322, n. 13, p. 1828-1833, jul. 2010. DOI: 10.1016/j.jmmm.2009.12.035.
87. VENKATPURWAR, Vinod; POKHARKAR, Varsh. Green synthesis of silver nanoparticles using marine polysaccharide: Study of *in-vitro* antibacterial activity. **Materials Letters**, v. 65, n. 6, p. 999-1002, 31 mar. 2011. DOI: 10.1016/j.matlet.2010.12.057.
88. SCHOEN, Pieter; BIJL, Liesbeth; WILSCHUT, Jan. Efficient encapsulation of plasmid DNA in anionic liposomes by a freeze/thaw-extrusion procedure. **Journal of Liposome Research**, v. 8, n. 4, p. 485-497, 28 set. 1998. DOI: 10.3109/08982109809039933.
89. GOKCE, Evren H. et al. Resveratrol-loaded solid lipid nanoparticles versus nanostructured lipid carriers: evaluation of antioxidant potential for dermal applications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 1841-1850, 11 abr. 2012. DOI: 10.2147/ijn.s29710.

90. ADITYA, Nayak P. et al. Curcumin and genistein coloaded nanostructured lipid carriers: *in vitro* digestion and antiprostata cancer activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 8, p. 1878-1883, 15 fev. 2013. DOI: 10.1021/jf305143k.
91. KIANI, Arezoo; FATHI, Milad; GHASEMI, Seyed M. Production of novel vitamin D3 loaded lipid nanocapsules for milk fortification. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 11, p. 2466-2476, 16 fev. 2017. DOI: 10.1080/10942912.2016.1240690.
92. JIANG, Kangiu; SHEN, Mingjin; XU, Weihua. Arginine, glycine, aspartic acid peptide-modified paclitaxel and curcumin co-loaded liposome for the treatment of lung cancer: *in vitro/vivo* evaluation. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 2561-2569, 27 abr. 2018. DOI: 10.2147/IJN.S157746.
93. SCHUH, Roselena S.; BRUXEL, Fernanda; TEIXEIRA, Helder F. Physicochemical properties of lecithin-based nanoemulsions obtained by spontaneous emulsification or high-pressure homogenization. **Química Nova**, v. 37, n. 7, p. 1193-1198, 2014. DOI: 10.5935/0100-4042.20140186.
94. SHI, Feng et al. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles loaded with frankincense and myrrh oil. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2033-2043, 17 abr. 2012. DOI:10.2147/IJN.S30085.
95. PASCUAL-VILLALOBOS, Maria J. et al. Use of nanoemulsions of plant essential oils as aphid repellents. **Industrial Crops and Products**, v. 110, p. 45-57, dez. 2017. DOI: 10.1016/j.indcrop.2017.05.019.
96. TAN, Mei-e et al. Development of solid lipid nanoparticles containing total flavonoid extract from *Dracocephalum moldavica* L. and their therapeutic effect against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 3253-3265, 19 abr. 2017. DOI: 10.2147/IJN.S131893.

97. IRAVANI, Siavash. Green synthesis of metal nanoparticles using plants. **Green Chemistry**, v. 13, n. 10, p. 2638-2650, 2011. DOI: 10.1039/C1GC15386B.
98. PEREIRA, Tatiana Aparecida. **Obtenção e caracterização de nanoemulsões O/A à base de óleo de framboesa, maracujá e pêssego: avaliação de propriedades cosméticas da formulação**. 119f., Dissertação (Mestrado em Medicamentos e Cosméticos). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, USP, São Paulo, 2011.
99. KALE, Santosh N.; DEORE, Sharada L. Emulsion Micro Emulsion and Nano Emulsion: A review. **Systematic Reviews in Pharmacy**, v. 8, n. 1, p. 39-47, jan/dez. 2017. DOI: 10.5530/srp.2017.1.8.
100. MCCLEMENTS, David J. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. **Soft Matter**, v.7, n.6, p. 2297-2316, 13 dez. 2011. DOI: 10.1039/C0SM00549E.
101. SILVA, Luciano Paulino. **Efeitos da suplementação com óleo de rã sobre a morfologia e funcionalidade do sistema imunitário e fígado de camundongos Swiss**. 2004. Tese (Doutorado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2004.
102. SILVA, Luciano P. et al. Effect of bullfrog (*Rana catesbeiana*) oil given by gavage on fatty acid composition and oxidative stress of mice liver. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n.10, p. 1491-1496, out. 2004. DOI: 10.1590/S0100-879X2004001000007
103. SILVA, Luciano P. et al. Effects of fish oil treatment on bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, p. 387-396, set-out. 2006. DOI: 10.1002/cbf.1237.

104. SILVA, Luciano P. et al. Comparative study of the antimicrobial activities and mammalian cytotoxicity of 10 fatty acid-rich oils and fats from animal and vegetable. **The Natural Products Journal**, v. 1, p. 40-46, 2011. DOI: 10.2174/2210315511101010040
105. MISTRY, Kshtij R; SARKER, Dipak K. SLNs can serve as the new brachytherapy seed: determining influence of surfactants on particle size of solid lipid microparticles and development of hydrophobised copper nanoparticles for potential insertion. **Journal of Chemical Engineering & Process Technology**, v. 7, n. 3, p. 1-9, 21 jul. 2016. DOI: 10.4172/2157-7048.1000302.
106. ZHANG, Linhan et al. Transparent dispersions of milk-fat-based nanostructured lipid carriers for delivery of β -Carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 39, p. 9435-9443, 19 set. 2013. DOI: 10.1021/jf403512c.
107. DIMOV, Nikolay et al. Formation and purification of tailored liposomes for drug delivery using a module-based micro continuous-flow system. **Scientific Reports**, v. 7, n. 12045, p. 1-13, 25 abr. 2017. DOI:10.1038/s41598-017-11533-1.
108. BRUCKMAN, Michael A. et al. Tobacco mosaic virus-based protein nanoparticles and nanorods for chemotherapy delivery targeting breast cancer. **Journal of Controlled Release**, v. 231, p. 103-113, jun. 2016. DOI:10.1016/j.jconrel.2016.02.045.
109. LEE, Seung-Wuk et al. Ordering of quantum dots using genetically engineered viruses. **Science**, v. 296, n. 5569, p. 892-895, 03 maio 2002. DOI: 10.1126/science.1068054.
110. WU, Lina et al. A green synthesis of carbon nanoparticles from honey and their use in real-time photoacoustic imaging. **Nano Research**, v. 6, n. 5, p.312-325, 12 abr. 2013. DOI: 10.1007/s12274-013-0308-8.

111. DU, Fengyi et al. Economical and green synthesis of bagasse-derived fluorescent carbon dots for biomedical applications. **IOP Publishing**, v. 25, n. 31, p. 315702-315712, 18 jul. 2014. DOI: 10.1088/0957-4484/25/31/315702.
112. ROSHNI, V.; OTTOOR, Divya. Synthesis of carbon nanoparticles using one step green approach and their application as mercuric ion sensor. **Journal of Luminescence**, v. 161, p.117-122, maio 2015. DOI: 10.1016/j.jlumin.2014.12.048.
113. SILVA, Luciano P.; RECH, Elibio L. Unravelling the biodiversity of nanoscale signatures of spider silk fibres. **Nature Communications**, v. 4, p. 1-9, 18 dec. 2013. DOI: 10.1038/ncomms4014.
114. SILVA, Luciano P.; RECH, Elibio L. Scrutinizing the datasets obtained from nanoscale features of spider silk fibres. **Scientific Data**, v. 1, p. 1-9, 14 out. 2014. DOI: 10.1038/sdata.2014.40.
115. MENEZES, Gabriela M. et al. Nanoscale investigations of synthetic spider silk fibers modified by physical and chemical processes. **Polymer Journal**, v. 45, n. 9, p. 997-1006, 6 mar. 2013. DOI: 10.1038/pj.2013.21.
116. LÜ, Peitao et al. Effects of nano-silver treatment on vase life of cut rose cv. Movie Star flowers. **Journal of Food, Agriculture and Environment**, v. 8, n. 2, p. 1118-1122, abr. 2010.
117. JAGTAP, Umesh B.; BAPAT, Vishwas A. Green synthesis of silver nanoparticles using *Artocarpus heterophyllus* Lam. seed extract and its antibacterial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 132-137, abr. 2013. DOI: 10.1016/j.indcrop.2013.01.019.
118. GOSWAMI, Shilpi; BAJPAI, Jaya; BAJPAI, Anil K. Calcium alginate nanocarriers as possible vehicles for oral delivery of insulin. **Journal of Experimental Nanoscience**, v. 9, n. 4, p. 337-356, 2012. DOI: 10.1080/17458080.2012.661472.

119. SAHA, Sandip et al. Photochemical green synthesis of calcium-alginate-stabilized Ag and Au nanoparticles and their catalytic application to 4-Nitrophenol reduction. **Langmuir**, v. 26, n. 4, p. 2885-2893, 3 dez. 2010. DOI: 10.1021/la902950x.
120. KIM, Young J. et al. Nanoemulsified green tea extract shows improved hypocholesterolemic effects in C57BL/6 mice. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 23, n. 2, p.186-191, fev. 2012. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2010.11.015.
121. CABRAL, E.C.M.; ZOLLNER, Ricardo L.; SANTANA, Maria H.A. Preparation and characterization of liposomes entrapping allergenic proteins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 21, n. 2, p. 137-146, jun. 2004. DOI: 10.1590/S0104-66322004000200002.
122. LU, Renquan et al. Egg white-mediated green synthesis of silver nanoparticles with excellent biocompatibility and enhanced radiation effects on cancer cells. **International Journal of Nanomedicine**, v. 7, p. 2101-2107, 24 abr. 2012. DOI: 10.2147/IJN.S29762.
123. KUMARI, Avnesh; KUMAR Vineet; YADAV Sudesh K. Plant extract synthesized PLA nanoparticles for controlled and sustained release of quercetin: A green approach. **PLoS ONE**, v. 7, n. 7, 23 jul. 2012. DOI: 10.1371/journal.pone.0041230.
124. HU, Che-Ming et al. Erythrocyte membrane-camouflaged polymeric nanoparticles as a biomimetic delivery platform. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 27, p. 10980-10985, 26 abr. 2011. DOI: 10.1186/s12951-018-0337-2.
125. PANDEY, Sadanand; GOSWAMI, Gopal K.; NANDA, Karuna K. Green synthesis of biopolymer-silver nanoparticle nanocomposite: An optical sensor for ammonia detection. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 51, n. 4, p. 583-589, 2012. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2012.06.033.

126. DU, Yongling et al. Composition and architecture-engineered Au-SnO₂/GNs-SWCNTs nanocomposites as ultrasensitive and robust electrochemical sensor for antioxidant additives in foods. **Sensors and Actuators B: Chemical**, v. 203, p. 926-934, nov. 2014. DOI: 10.1016/j.snb.2014.06.094
127. ZHU, Chenzhou et al. Reducing sugar: New functional molecules for the green synthesis of graphene nanosheets. **ACS Nano**, v. 4, n. 4, p. 2429-2437, 1 abr. 2010. DOI: 10.1021/nn1002387.
128. SUGUMAR, Saranya et al. Bio-based nanoemulsion formulation, characterization and antibacterial activity against food-borne pathogens. **Journal of Basic Microbiology**, v. 53, n. 8, p. 677-685, 7 set. 2012. DOI: 10.1002/jobm.201200060.
129. SARAVANAN, Chinnashanmugam et al. Synthesis of silver nanoparticles using bacterial exopolysaccharide and its application for degradation of azo-dyes. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 33-40, set. 2017. DOI: 10.1016/j.btre.2017.02.006.
130. GENÇ, Rukan et al. Green synthesis of gold nanoparticles using glycerol-incorporated nanosized liposomes. **Langmuir**, v. 27, n. 17, p. 10894-10900, 25 jul. 2011. DOI: 10.1021/la201771s.
131. SAPSFORD, Kim E. et al. Analyzing nanomaterial bioconjugates: A review of current and emerging purification and characterization techniques. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 12, p. 4453-4488, 15 jun. 2011. DOI: 10.1021/ac200853a.
132. EDISON, Thomas J.I.; SETHURAMAN, M.G. Instant green synthesis of silver nanoparticles using *Terminalia chebula* fruit extract and evaluation of their catalytic activity on reduction of methylene blue. **Process Biochemistry**, v. 47, n. 9, p. 1351-1357, set. 2012. DOI: 10.1016/j.procbio.2012.04.025.

133. MEDEIROS, Kelliane Almeida. **Desenvolvimento e testes *in vitro* de nanopartículas de quitosana para liberação controlada de peptídeos antitumorais**. 2011. 76 f., Dissertação (Mestrado em Biologia Animal)-Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
134. LIU, Xiaoli. et al. Green and facile synthesis of highly biocompatible carbon nanospheres and their pH-responsive delivery of doxorubicin to cancer cells. **RSC Advances**, v. 5, p. 17532-17540, 2015. DOI: 10.1039/C4RA16359A.
135. MOHAMMADI, Reza; KASSAEE, Mohammad Z. Sulfochitosan encapsulated nano-Fe₃O₄ as an efficient and reusable magnetic catalyst for green synthesis of 2-amino-4H-chromen-4-yl phosphonates. **Journal of Molecular Catalysis A: Chemical**, v. 380, p. 152-158, dez. 2013. DOI: 10.1016/j.molcata.2013.09.027.
136. MOSADDEGH, Elaheh. Ultrasonic-assisted preparation of nano eggshell powder: A novel catalyst in green and high efficient synthesis of 2-aminochromenes. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, n. 6, p. 1436-1441, nov. 2013. DOI: 10.1016/j.ultsonch.2013.04.008.
137. SUI, Zhuyin et al. Easy and green synthesis of reduced graphite oxide-based hydrogels. **Carbon**, v. 49, n. 13, p. 4314-4321, nov. 2011. DOI: 10.1016/j.carbon.2011.06.006.
138. ZHENG, Qifeng; CAI, Zhyong; GONG, Shaogin. Green synthesis of polyvinyl alcohol (PVA)-cellulose nanofibril (CNF) hybrid aerogels and their use as superabsorbents. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 9, p. 3110-3118, 16 dec. 2013. DOI: 10.1039/C3TA14642A.
139. ASTM. Zeta potential of colloids in water and waste water. **ASTM Standard D**, 4187-4182, 1985.

140. SATHISHKUMAR, Muthuswamy et al. *Cinnamon zeylanicum* bark extract and powder mediated green synthesis of nano-crystalline silver particles and its bactericidal activity. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 332-338, out. 2009. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.06.005.
141. SUARASAN, Sorina et al. One-pot, green synthesis of gold nanoparticles by gelatin and investigation of their biological effects on osteoblast cells. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 132, p. 122-131, 1 ago. 2015. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2015.05.009.
142. SHAH, Rohan et al. Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. **Journal of Physical Science**, v. 25, n. 1, p. 59-75, 2014.
143. LÓPEZ-SERRANO, Ana et al. Nanoparticles: a global vision. Characterization, separation, and quantification methods. Potential environmental and health impact. **Analytical Methods**, v. 6, n. 1, p. 38-56, 2014. DOI: 10.1039/C3AY40517F.
144. NAJAVI, Ezzatolla et al. A novel magnetic ion imprinted nano-polymer for selective separation and determination of low levels of mercury(II) ions in fish samples. **Food Chemistry**, v. 141, n. 4, p. 4040-4045, dez. 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.06.118.
145. KHANI, Rouhollah; SOBHANI, Sara; BEYKI, Mostafa H. Highly selective and efficient removal of lead with magnetic nano-adsorbent: Multivariate optimization, isotherm and thermodynamic studies. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 466, p. 198-205, 15 mar. 2016. DOI: 10.1016/j.jcis.12.027.

146. JAWOOR, Shailaja S. et al. Green synthesis of nano sized transition metal complexes containing heterocyclic Schiff base: Structural and morphology characterization and bioactivity study. **Journal of Molecular Structure**, v. 1164, p. 378-385, 15 jul. 2018. DOI: 10.1016/j.molstruc.2018.03.084.
147. HONARMAND, Moones. Green synthesis of a nano salt and its application as multifunctional organocatalyst for Knoevenagel condensation. **Research on Chemical Intermediates**, v. 43, n. 11, p. 6421-6432, 14 jun. 2017. DOI: 10.1007/s11164-017-2998-0.
148. ABDEL-AZIZ, Mohamed S. et al. Green synthesis of silver nanoparticles by *Macrococcus bovicus* and its immobilization onto montmorillonite clay for antimicrobial functionality. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 176, n. 8, p. 2225-2241, 23 jun. 2015. DOI: 10.1007/s12010-015-1710-3.
149. BONYASI, Fahimeh; HEKMATI, Malak; VEISI, Hojat. Preparation of core/shell nanostructure $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{PEG400-SO}_3\text{H}$ as heterogeneous and magnetically recyclable nanocatalyst for one-pot synthesis of substituted pyrroles by Paal-Knorr reaction at room temperature. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 496, p. 177-187, 15 jun. 2017. DOI: 10.1016/j.jcis.2017.02.023.
150. MATINISE, Nolubabalo et al. ZnO nanoparticles via *Moringa oleifera* green synthesis: Physical properties & mechanism of formation. **Applied Surface Science**, v. 406, p. 339-347, ju. 2017. DOI: 10.1016/j.apsusc.2017.01.219.
151. KHAN, Younus H. et al. Novel green nano composites films fabricated by indigenously synthesized graphene oxide and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 146, p. 131-138, 1 ago. 2016. DOI: 10.1016/j.carbpol.2016.03.031.

152. WANG, Fang et al. Tunable green graphene-silk biomaterials: Mechanism of protein-based nanocomposites. **Materials Science and Engineering**, v. 79, p. 728-739, 1 out. 2017. DOI: 10.1016/j.msec.2017.05.120.
153. BAUDOT, Charles; TAN, Cher M.; KONG, Jeng C. FTIR spectroscopy as a tool for nano-material characterization. **Infrared Physics & Technology**, v. 53, n. 6, p. 434-438, nov. 2010. DOI: 10.1016/j.infrared.2010.09.002.
154. MAITY, Mritunjoy; DAS, Supriya; MAITI, Nakul C. Stability and binding interaction of bilirubin on gold nanosurface: steady state fluorescence and FT-IR investigation. **Physical Chemistry Chemical Physics**, v. 16, n. 37, p. 20013-20022, 7 out. 2014. DOI: 10.1039/c4cp02649g.
155. PRASAD, Kumar S.; GANDHI, Pooja; SELVARAJ, Kaliaperumal. Synthesis of green nano iron particles (GnIP) and their application in adsorptive removal of As(III) and As(V) from aqueous solution. **Applied Surface Science**, v. 317, p. 1052-1059, 30 out. 2014. DOI: 10.1016/j.apsusc.2014.09.042.
156. SHI, Feng; DENG, Youquan. Abnormal FT-IR and FT-Raman spectra of ionic liquids confined in nano-porous silica gel. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 62, n. 1-3, p. 239-244, nov. 2005. DOI:10.1016/j.saa.2004.12.031.
157. AOKI, Pedro H. B. et al. Taking advantage of electrostatic interactions to grow Langmuir-Blodgett films containing multilayers of the phospholipid dipalmitoylphosphatidylglycerol. **Langmuir**, v. 25, n. 22, p. 13062-13070, 14 jul. 2009. DOI: 10.1021/la901923v.

158. VOLPATI, Diogo et al. Exploiting distinct molecular architectures of ultrathin films made with iron phthalocyanine for sensing. **Journal of Physical Chemistry B**, v. 112, n. 48, p. 15275-15282, 4 dez. 2008. DOI: 10.1021/jp804159h.
159. GHIABI, Caesar et al. *In situ*, one-step and co-electrodeposition of graphene supported dendritic and spherical nano-palladium-silver bimetallic catalyst on carbon cloth for electrooxidation of methanol in alkaline media. **Renewable Energy**, v. 126, p. 1085-1092, out. 2018. DOI: 10.1016/j.renene.2018.04.040.
160. AKTER, Mahmuda et al. *Brassica rapa* var. japonica leaf extract mediated green synthesis of crystalline silver nanoparticles and evaluation of their stability, cytotoxicity and antibacterial activity. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, v. 28, n. 4, p. 1483-1493, 5 mar. 2018. DOI: 10.1007/s10904-018-0818-7.
161. SILVA, Luciano Paulino; BEMQUERER, Marcelo Porto. **Análise de Peptídeos e Proteínas por Espectrometria de Massa**. In: Ana Cristina Miranda Brasileiro; Vera Tavares de Campos Carneiro. (Org.). Manual de transformação genética de plantas. 2 ed. Brasília: Embrapa, v. 1, p. 401-416, 2015.
162. KUMAR, C. Ganesh; POORNACHANDRA, Y.; CHANDRASEKHAR, Cheemalamarri. Green synthesis of bacterial mediated anti-proliferative gold nanoparticles: inducing mitotic arrest (G2/M phase) and apoptosis (intrinsic pathway). **Nanoscale**, v. 7, n. 44, p. 18738-18750, 2015. DOI:10.1039/C5NR04577K.
163. SINGH, Priyanka et al. Green synthesis of gold and silver nanoparticles from *Cannabis sativa* (industrial hemp) and their capacity for biofilm inhibition. **International Journal of Nanomedicine**, v. 13, p. 3571, 2018. DOI: 10.2147/IJN.S157958.

164. BARROS, Rodrigo M. et al. Application of mesocellular siliceous foams (MCF) for surface-assisted laser desorption ionization mass spectrometry (SALDI-MS) Analysis of fingerprints. **Science & Justice**, v. 58, n. 4, p. 264-270, jul. 2018. DOI: 10.1016/j.sci-jus.2018.03.005.
165. PARK, Jonghoo et al. A mechanical nanomembrane detector for time-of-flight mass spectrometry. **Nano Letters**, v. 11, n. 9, p. 3681-3684, 2 ago. 2011. DOI: 10.1021/nl201645u.
166. HOUBART, Virginie et al. Development of a nano-liquid chromatography on chip tandem mass spectrometry method for high-sensitivity hepcidin quantitation. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 50, p. 9046-9054, 2011. DOI:10.1016/j.chroma.2011.10.030.
167. D'ORAZIO, Giovanni; ROCCHI, Silvia; FANALI, Salvatore. Nano-liquid chromatography coupled with mass spectrometry: Separation of sulfonamides employing non-porous core-shell particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 277-285, 14 set. 2012. DOI: 10.1016/j.chroma.2012.03.032.
168. PARK, Jonghoo et al. Phonon-assisted field emission in silicon nanomembranes for time-of-flight mass spectrometry of proteins. **Nano Letters**, v. 13, n. 6, p. 2698-2703, 29 abr. 2013. DOI: 10.1021/nl400873m.
169. WU, Zhen et al. Efficient separations of intact proteins using slip-flow with nano-liquid chromatography-mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 86, n. 3, p. 1592-1598, 2 jan. 2014. DOI: 10.1021/ac403233d.
170. REN, Yue et al. Direct mass spectrometry analysis of biofluid samples using slug-flow microextraction nano-electrospray ionization. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 53, n. 51, p. 14124-14127, 5 out. 2014. DOI: 10.1002/anie.201408338.

171. REGINSKAYA, Irina et al. Emitter-assigned multi-dielectric barrier-nano-electrospray ionization mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6537-6542, 18 jun. 2015. DOI: 10.1007/s00216-015-8821-0.
172. LIN, Ping-chang et al. Techniques for physicochemical characterization of nanomaterials. **Biotechnology Advances**, v. 32, n. 4, p.711-726, jul. 2014. DOI: 10.1016/j.biotechadv.2013.11.006.
173. GAUTAM, Vineeta et al. Preparation and characterization of green-nano-composite material based on polyaniline, multiwalled carbon nano tubes and carboxymethyl cellulose: For electrochemical sensor applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 189, p. 218-228, 1 jun. 2018. DOI: 10.1016/j.carbpol.2018.02.029.
174. SAHA, Sandip; WANG, J.M.; PAL, Anjali. Nano silver impregnation on commercial TiO₂ and a comparative photocatalytic account to degrade malachite green. **Separation and Purification Technology**, v. 89, p. 147-159, 22 mar. 2012. DOI: 10.1016/j.seppur.2012.01.012.
175. HALDORAI, Yuvaraj; VOIT, Walter; SHIM, Jae-Jin. Nano ZnO@reduced graphene oxide composite for high performance supercapacitor: Green synthesis in supercritical fluid. **Electrochimica Acta**, v. 120, p. 65-72, 20 fev. 2014. DOI: 10.1016/j.electacta.2013.12.063.
176. KIM, J.H. et al. Raman spectroscopy of ZnS nanostructures. **Journal of Raman Spectroscopy**, v. 43, n. 7, p. 906-910, 20 mar. 2012. DOI: 10.1002/jrs.3116.
177. SILVA, Luciano P. Scrutinizing the nanostructural and nanomechanical features of regenerated cellulose ultrafiltration membranes. **Journal of Membrane and Separation Technology**, v. 4, n. 1, p.25-31, 13 mar. 2015. DOI: 10.6000/1929-6037.2015.04.01.4.

178. MELO, Jorge Alex Taquita. **Caracterização molecular, ultraestrutural e nanoestrutural do copal de jatobá (*Hymenaea courbaril* L.) e estudo das modificações químicas e estruturais resultantes da interação do solubilizado do copal com lipossomas.** 2017. 92 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2017.
179. SOUZA, Marco Antonio de. **Desenvolvimento de um método analítico para a detecção de metanfetamina utilizando Espalhamento Raman Intensificado por Superfície (SERS).** 2018. xiv, 116 f., il. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia)-Universidade de Brasília, Brasília, 2018.
180. SINGH, Vijay et al. EPR and optical properties of green emitting Mn-doped BaMgAl₁₀O₁₇ nano-phosphors prepared by a combustion reaction. **Journal of Materials Science Materials in Electronics**, v. 27, n. 4, p. 3697-3703, 9 dez. 2016. DOI: 10.1007/s10854-015-4210-x.
181. WU, Yiwei et al. Facile fabrication of Ag₂(bdc)@Ag nano-composites with strong green emission and their response to sulfide anion in aqueous medium. **Sensors & Actuators: B Chemical**, v. 255, p. 3163-3169, fev. 2018. DOI: 10.1016/j.snb.2017.09.141.
182. WANG, Yanfei et al. Controlled Synthesis of Water-Dispersible Faceted Crystalline Copper Nanoparticles and Their Catalytic Properties. **Chemistry-A European Journal**, v. 16, n. 35, p. 10735-10743, 2010. DOI: 10.1002/chem.201000354
183. SHARMA, Rekha; DHILLON, Ankita; KUMAR, Dinesh. Mentha-Stabilized Silver Nanoparticles for High-Performance Colorimetric Detection of Al (III) in Aqueous Systems. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-13, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-23469-1

184. AMENDOLA, Vincenzo; BAKR, Osman M.; STELLACCI, Francesco. A study of the surface plasmon resonance of silver nanoparticles by the discrete dipole approximation method: effect of shape, size, structure, and assembly. **Plasmonics**, v. 5, n. 1, p. 85-97, 12 jan. 2010. DOI: 10.1007/s11468-009-9120-4.
185. CHEN, Xing; JENSEN, Lasse. Understanding the shape effect on the plasmonic response of small ligand coated nanoparticles. **Journal of Optics**, v. 18, n. 7, p. 074009, 31 maio 2016. DOI: 10.1088/2040-8978/18/7/074009/meta.
186. ASWATHY, B. et al. Microwave assisted synthesis and UV–Vis spectroscopic studies of silver nanoparticles synthesized using vanillin as a reducing agent. **Journal of Molecular Liquids**, v. 159, p. 165-169, jan. 2011. DOI: 10.1016/j.molliq.2011.01.001
187. XUE, Can; MIRKIN, Chad A. pH-switchable silver nanoprism growth pathways. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 12, p. 2036-2038, 2 mar. 2007. DOI: 10.1002/anie.200604637.
188. GIGAULT, Julien; CHO, Tae J.; MACCUSPIE, Robert I. Gold nanorod separation and characterization by asymmetric-flow field flow fractionation with UV–Vis detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, p. 1191-1202, nov. 2012. DOI: 10.1007/s00216-012-6547-9.
189. LINIC, Suljo; CHRISTOPHER, Philip; INGRAM, David B. Plasmonic-metal nanostructures for efficient conversion of solar to chemical energy. **Nature Materials**, v. 10, n. 12, p. 911-921, 23 nov. 2011. DOI: 10.1038/nmat3151.
190. BHATTE, Kushal D. et al. One pot green synthesis of nano sized zinc oxide by sonochemical method. **Materials Letters**, v. 77, p. 93-95, 15 jun. 2012. DOI: 10.1016/j.matlet.2012.03.012.

191. KHAN, Zaheer et al. Natural sugar surfactant capped gold nano-disks: Aggregation, green synthesis and morphology. **Dyes and Pigments**, v. 124, p. 210-221, jan. 2016. DOI: 10.1016/j.dyepig.2015.08.026.
192. KHAN, Mohd D.; AHN, Ji W.; NAM, Gnu. Environmental benign synthesis, characterization and mechanism studies of green calcium hydroxide nano-plates derived from waste oyster shells. **Journal of Environmental Management**, v. 223, p. 947-951, 1 out. 2018. DOI: 10.1016/j.jenvman.2018.07.011.
193. REDDY, A. Jagannatha et al. Structural, optical and EPR studies on ZnO:Cu nanopowders prepared via low temperature solution combustion synthesis. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 509, n. 17, p. 5349-5355, 18 abr. 2011. DOI: 10.1016/j.jallcom.2011.02.043.
194. MOUTAUNG, David E. et al. Shape-selective dependence of room temperature ferromagnetism induced by hierarchical ZnO nanostructures. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 6, n. 12, p. 8981-8995, 20 maio 2014. DOI: 10.1021/am501911y.
195. CHIARADIA, Mariza C.C.; COLLINS, Carol H.; JARDIM, Isabel C.S.F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008. DOI: 10.1590/S0100-40422008000300030.
196. KIRAN, G. Seghal; SABU, A.; SELVIN, Joseph. Synthesis of silver nanoparticles by glycolipid biosurfactant produced from marine *Brevibacterium casei* MSA19. **Journal of Biotechnology**, v. 148, p. 221-225, 4 ago. 2010. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2010.06.012.

197. GHASEMI, Ensieh; SILLANPÄÄ, Mika. Optimization of headspace solid phase microextraction based on nano-structured ZnO combined with gas chromatography-mass spectrometry for preconcentration and determination of ultra-traces of chlorobenzenes in environmental samples. **Talanta**, v. 130, p. 322-327, 1 dec. 2014. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.06.030.
198. ALI, Imran; AL-OTHMAN, Zeid A.; ALWARTHAN, Abdulrahman. Green synthesis of functionalized iron nano particles and molecular liquid phase adsorption of ametryn from water. **Journal of Molecular Liquids**, v. 221, p. 1168-1174, set. 2016. DOI: 10.1016/j.molliq.2016.06.089.
199. CHOWDHURY, Sreya R.; GHOSH, Srabanti; BHATTACHRYA, Swapan K. Improved catalysis of green-synthesized Pd-Ag alloy-nanoparticles for anodic oxidation of methanol in alkali. **Electrochimica Acta**, v. 225, p. 310-321, 20 jan. 2017.
200. PARK, Mi O. Composition and distribution of phytoplankton with size fraction results at southwestern east/Japan sea. **Ocean Science Journal**, v. 41, n. 4, p. 301-313, 22 dez. 2006. DOI: 10.1007/BF03020632.
201. JHA, Anal K. et al. Plant system: nature's nanofactory. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 73, n. 2, p. 219-223, out. 2009. DOI: 10.1016/j.colsurfb.2009.05.018.
202. WANG, Wangxia; VINOCUR, Basia; ALTMAN, Arie. Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: Towards genetic engineering for stress tolerance. **Planta**, v. 218, n. 1, p. 1-14, 26 set. 2003. DOI: 10.1007/s00425-003-1105-5.
203. SHANKAR, S. Shiv et al. Bioreduction of chloroaurate ions by geranium leaves and its endophytic fungus yields gold nanoparticles of different shapes. **Journal Of Materials Chemistry**, v. 13, p. 1822-1826, 2003. DOI: 10.1039/B303808B.

204. WARDLE, David A. et al. An ecosystem-level perspective of allelopathy. **Biological Reviews**, v. 73, n. 3, p.305-319, 11 jan. 2007. DOI: 10.1111/j.1469-185x.1998.tb00033.x.
205. DEMMING-ADAMS, B.; ADAMS W. W. 1992. Photoprotection and other responses of plants to high light stress. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, v. 43, p. 599-626, jun. 1992. DOI: 10.1146/annurev.pp.43.060192.003123.
206. RUBAN, Alexander V. Plants in light. **Communicative & Integrative Biology**, v. 2, n. 1, p. 50-55, 2009. DOI: 10.4161/cib.2.1.7504.
207. CHEONG, Yong et al. Transcriptional profiling reveals novel interactions between wounding, pathogen, abiotic stress, and hormonal responses in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v. 129, n. 2, p. 661-677, jun. 2002. DOI: 10.1104/pp.002857.
208. VISWANATH, Balakrishnan et al. Predicting the growth of two-dimensional nanostructures. **Nanotechnology**, v. 19, n. 19, p.195603-195610, 7 abr. 2008. DOI: 10.1088/0957-4484/19/19/195603.
209. PERETYAZHKO, Tanya S.; ZHANG, Qingbo; COLVIN, Vicki L. Size-Controlled dissolution of silver nanoparticles at neutral and acidic pH conditions: Kinetics and size changes. **Environmental Science & Technology**, v. 48, n. 20, p.11954-11961, 10 out. 2014. DOI: 10.1021/es5023202.
210. GARG, Shikha et al. Oxidative dissolution of silver nanoparticles by chlorine: implications to silver nanoparticle fate and toxicity. **Environmental Science & Technology**, v. 50, n. 7, p.3890-3896, 25 mar. 2016. **American Chemical Society**. DOI: 10.1021/acs.est.6b00037.
211. HE, Di; GARG, Shikha; WAITE, T. David. H₂O₂-Mediated oxidation of zero-valent silver and resultant interactions among silver nanoparticles, silver ions, and reactive oxygen species. **Langmuir**, v. 28, n. 27, p. 10266-10275, 26 jun. 2012. DOI: 10.1021/la300929g.

212. OBERDÄRSTER, Günter; BERDÄRSTER, Eva; OBERDORSTER, Jan. Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. **Environmental Health Perspectives**, v. 113, n. 7, p. 823-839, 22 mar. 2005. DOI: 10.1289/ehp.7339.
213. OBERDÄRSTER, Günter. Safety assessment for nanotechnology and nanomedicine: concepts of nanotoxicology. **Journal of Internal Medicine**, v. 267, n. 1, p.89-105, jan. 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2796.2009.02187.x.
214. BERTI, R. Antunes; PORTO, L. Marques. **Nanossegurança: guia de boas práticas em nanotecnologia para fabricação e laboratórios**. Ed. Cengage. 2017.
215. PEREIRA, Tatiane Melo et al. Modulating physical, chemical, and biological properties of silver nanoparticles obtained by green synthesis using different parts of the tree *Handroanthus heptaphyllus* (Vell.) Mattos. **Colloid and Interface Science Communications**, v. 34, p. 100224, 2020. DOI: 10.1016/j.colcom.2019.100224.
216. ARAUJO, Thalita Fonseca et al. Enzymatic Browning Modulates Properties of Silver Nanoparticles Produced with Banana Peel Extract. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, p. 1-7, 2020. DOI: 10.1007/s10904-020-01510-z.
217. PUPE, Julia Moreira; SILVA, Luciano Paulino. Modulation of Physico-Chemical and Biological Properties of Silver Nanoparticles Synthesized Using Aqueous Extract of Flamboyant (*Delonix regia* var. *flavida*, Fabaceae) Seeds. **Journal of Cluster Science**, p. 1-8, 2020. DOI: 10.1007/s10876-020-01871-y.
218. NETO, Lucio Assis Araujo; PEREIRA, Tatiane Melo; SILVA, Luciano Paulino. Evaluation of behavior, growth, and swarming formation of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in culture medium modified with silver nanoparticles. **Microbial Pathogenesis**, v. 149, p. 104480, 2020. DOI: 10.1016/j.micpath.2020.104480.

219. VIJAYAKUMAR, Sekar et al. Biological Compound Capping of Silver Nanoparticle with the Seed Extracts of Blackcumin (*Nigella sativa*): A Potential Antibacterial, Antidiabetic, Anti-inflammatory, and Antioxidant. **Journal of Inorganic and Organometallic Polymers and Materials**, p. 1-12, 2020. DOI: 10.1007/s10904-020-01713-4.
220. SANTIAGO, Thaís R. et al. Green synthesis of silver nanoparticles using tomato leaf extract and their entrapment in chitosan nanoparticles to control bacterial wilt. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 99, n. 9, p. 4248-4259, 2019. DOI: 0.1002/jsfa.9656.
221. OLIVEIRA, Giselle Zayra Silva et al. Synthesis of silver nanoparticles using aqueous extracts of *Pterodon emarginatus* leaves collected in the summer and winter seasons. **International Nano Letters**, v. 9, n. 2, p. 109-117, 2019. DOI: 10.1007/s40089-019-0265-7.
222. SILVA, Luciano Paulino et al. Green Nanoparticles for Biomedical and Bioengineering Applications. In: **Nanoparticles and their Biomedical Applications**. Springer, Singapore, 2020. p. 225-262. DOI: 10.1007/978-981-15-0391-7_9.
223. SILVA, Luciano Paulino; PEREIRA, Tatiane Melo; BONATTO, Cíntia Caetano. Frontiers and perspectives in the green synthesis of silver nanoparticles. In: **Green Synthesis, Characterization and Applications of Nanoparticles**. Elsevier, 2019. p. 137-164. DOI: 10.1016/B978-0-08-102579-6.00007-1.
224. SILVA, Luciano Paulino; BONATTO, Cíntia Caetano. Green Nanotechnology for **Sustained Release of Eco-Friendly Agrochemicals**. In: **Sustainable Agrochemistry**. Springer, Cham, 2019. p. 113-129. DOI: 10.1007/978-3-030-17891-8_4.

CAPÍTULO 5

Microscopia eletrônica de transmissão e de varredura como ferramentas de caracterização de nanossistemas

Tatiane Oliveira dos Santos^{1*}, Renata Montenegro Igo²

1. Introdução

Ao longo dos últimos anos, os campos da nanociência e da nanotecnologia avançaram notavelmente, em grande parte devido aos equipamentos, aos métodos de caracterização e à acessibilidade aos equipamentos desenvolvidos a partir dos anos 1980. Esses campos estudam a matéria no âmbito da escala atômica e molecular, geralmente menores do que 100 nanômetros, a fim de compreender a relação entre síntese, estruturas e propriedades, tais como topografia (características de superfície), morfologia (forma e tamanho das partículas que compõem o objeto), composição (identificação dos elementos que compõem a amostra) e informação cristalográfica (como os átomos estão organizados no objeto). De posse dessas informações, podem-se definir aplicações específicas para cada tipo de nanossistemas¹.

O estudo de nanomateriais não é simples de ser realizado, impondo uma série de restrições e desafios aos pesquisadores. Muitas técnicas tradicionais não funcionam nessa escala, por exemplo, não é possível usar a microscopia óptica, uma vez que sua resolução é limitada pelos

1.Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução da Universidade Federal de Goiás (LabMic/UFG), Goiânia, Goiás, Brasil.

2.Instituto Federal do Paraná - Campus Paranaguá, Paranaguá, Paraná.

*E-mail: tatiane_oliveira@ufg.br.

efeitos da difração da luz visível, sendo de 0,2 μm para um aumento útil máximo de 1.000 vezes². Qualquer partícula menor do que esse limite é indistinguível.

Por outro lado, a microscopia eletrônica é uma técnica atual que desempenha um papel fundamental na compreensão da natureza desses nanossistemas, permitindo a obtenção de informações sobre as propriedades morfológicas e físico-químicas de nanocomponentes individuais, bem como suas relações espaciais. Utilizam-se elétrons em vez da luz, possuem comprimento de onda λ curto (por exemplo, $\lambda = 0,005 \text{ nm}$ para uma voltagem de aceleração de 50 kV), quando comparado com os comprimentos de luz visível ($\lambda = 400 \text{ a } 700 \text{ nm}$), oferecendo, assim, maior resolução.

Da interação dos elétrons do feixe incidente com a amostra surgem vários tipos de espalhamentos, tais como: elétrons secundários, elétrons retroespalhados e raios X característicos. Se a amostra for suficientemente fina, ainda há os elétrons transmitidos. Cada espalhamento contém uma informação característica da amostra, como morfologia, espectroscopia, cristalografia, composição, podendo obter informações de experimentos *in situ*, dentre outras. Essas informações auxiliam no aperfeiçoamento de nanossistemas, otimizando suas aplicações.

Os dois tipos básicos de microscópios eletrônicos são o microscópio eletrônico de varredura (MEV) e o microscópio eletrônico de transmissão (MET). A microscopia eletrônica de varredura é uma técnica amplamente utilizada em diversas áreas, sua varredura é superficial, e, por isso, fornece informações de topografia, identificação elementar qualitativa e quantitativa. Atualmente, os mais avançados microscópios eletrônicos de varredura podem chegar à resolução de 0,6 nm³. O MET, por sua vez, é uma das ferramentas mais importantes de caracterização com alta resolução espacial. Nos dias atuais, os equipamentos mais avançados já contam com resolução menor que 0,05 nm^{4,5}.

Neste capítulo, serão abordados os princípios básicos da microscopia eletrônica e o funcionamento do MEV e do MET, a fim de compreender suas aplicações e obter resultados confiáveis e conclusivos para a caracterização de nanossistemas.

2. Breve histórico

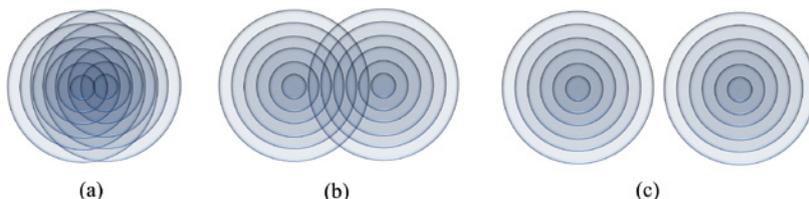
Em 1931, Max Knoll e Ernest Ruska desenvolveram o primeiro microscópio eletrônico na Alemanha, com três lentes magnéticas (condensadora, objetiva e projetora). Apesar da ampliação pequena, cerca de 14,4 vezes, o aparato provou que imagens de espécimes irradiados também podiam ser obtidas através de feixes de elétrons e campos magnéticos, e não apenas por luz. A utilização prática dessas imagens era extremamente limitada devido à pouca ampliação, mostrando que a resolução ainda era uma questão importante a ser resolvida para obter microscópios mais eficientes^{6,7}.

O limite de resolução pode ser definido como a separação mínima entre dois objetos para que eles possam ser totalmente distinguíveis, ou seja, quanto menor for o limite de resolução, maior será a resolução ou o poder de resolução⁸. O limite de resolução na microscopia óptica está relacionado com o comprimento de onda λ da luz. A luz proveniente de um ponto do objeto atravessa uma série de aberturas circulares, por exemplo, diafragmas e lentes. Dessa forma, a imagem de um ponto não será puntiforme por causa da limitação imposta pela difração nas aberturas⁹. Se dois pontos do objeto estiverem muito próximos, os discos centrais de difração das suas imagens se sobreporão, conforme observado na Figura 1(a).

O critério de Rayleigh define a menor distância possível entre dois objetos luminosos pontuais na qual os dois objetos são distinguíveis. Ainda afirma que os corpos começam a ser distinguíveis quando o centro do padrão de difração de um deles coincide com o primeiro mínimo de difração do outro¹⁰, conforme é mostrado na Figura 1(b). Na

Figura 1(c), já é possível distinguir totalmente os dois objetos, pois os padrões de difração não se encontram.

Figura 1: Padrão de difração formado por dois objetos luminosos pontuais (a) com superposição, (b) no limite de resolução dado pelo critério de Rayleigh e (c) totalmente separados



Fonte: elaborada pelos autores.

Portanto, a resolução do microscópio óptico depende somente do efeito de difração da luz. A menor distância é o raio do primeiro mínimo do padrão de difração associado a um ponto do objeto, ou raio do disco de Airy (R_d), cujo valor é dado pela equação^{8,10}:

$$R_d = \frac{0,61}{NA} \quad (1)$$

em que λ é o comprimento de onda da luz; NA é o número de aberturas ou abertura numérica da lente.

O físico Ernst Abbé, analisando em detalhe a resolução dos microscópios ópticos, observou que quanto maior fosse o número de aberturas (NA) na equação (1) menor seria o valor de R_d , mostrando que aberturas numéricas altas produzem melhor resolução⁸. Abbé propôs, assim, que a relação para o limite de resolução δ decorre diretamente da equação (1), podendo ser reescrita como:

$$\delta = \frac{0,61}{\lambda NA} \quad (2)$$

Até então, Knoll e Ruska não tinham conhecimento da teoria de De Broglie sobre as ondas de matéria. Em 1986, Ruska recebeu o prêmio Nobel de Física por seu trabalho fundamental em óptica eletrônica e pelo projeto do primeiro microscópio eletrônico. Em seu discurso menciona que, ao ter conhecimento das ondas de matéria, ficou desapontado pela resolução do microscópio eletrônico também estar limitada pelo comprimento de onda. Contudo, ao se aprofundar na teoria de De Broglie, surpreendeu-se ao notar que as ondas associadas aos elétrons deveriam ter comprimentos de onda muito menores do que as ondas de luz e, em virtude disso, não haveria razão para abandonar a sua ideia da microscopia.

Em 1938, Manfred von Ardenne construiu o primeiro microscópio de transmissão-varredura. O primeiro microscópio eletrônico de varredura usado para observar superfície de amostras espessas foi descrito por Zworykin, em 1948¹². Desde então, houve uma rápida evolução dos microscópios e um grande avanço na qualidade e no conteúdo da informação obtida com a microscopia eletrônica computadorizada e os sistemas com resolução subangstrom.

O microscópio eletrônico atual, seja ele de transmissão, seja de varredura, tem fornecido informações analíticas, juntamente com a observação da ultraestrutura e da morfologia. Essas informações podem ser qualitativas (identificação e localização de elementos químicos) ou semiquantitativas, que informam sobre concentrações relativas ou absolutas, respectivamente, de elementos presentes na amostra.

Com a nova geração de microscópios com correção da aberração esférica, têm-se obtido imagens com resolução suficiente para mostrar a separação entre dois átomos com distância menor que 0,05 nm^{5,13-15}. Além disso, as técnicas acopladas aos microscópios eletrônicos têm evoluído significativamente, aumentando a capacidade de fornecer inúmeras informações. Isso tem tornado a microscopia eletrônica indispensável às pesquisas em nanotecnologia e em nanossistemas.

2.1. Postulado de De Broglie

Louis De Broglie, em sua tese apresentada em 1924, propôs a existência de ondas de matéria. Como um fóton tem associada uma onda luminosa que governa seu movimento, uma partícula carregada (por exemplo, elétrons e prótons) também tem associada uma onda de matéria que governa o seu movimento. Em outras palavras, a luz possui uma natureza dual, comportando-se ora como onda, ora como partícula. A mesma dualidade é válida para a matéria, podendo se comportar ora como onda, ora como partícula^{10,11}.

De acordo com De Broglie, tanto para a matéria quanto para a radiação, a energia total E está relacionada com a frequência ν da onda associada ao seu movimento pela equação:

$$E = h\nu \quad (3)$$

sendo h a constante de Planck, com valor de $6,62 \times 10^{-39}$ J.s.

De Broglie postulou que uma partícula livre com massa de repouso m , deslocando-se com velocidade não relativística v , deve ter um comprimento de onda λ associado a seu momento linear $p = mv$, do mesmo modo que um fóton, dado por:

$$\lambda = h / p \quad (4)$$

O comprimento de onda λ de De Broglie de uma partícula é, então:

$$\lambda = h / mv \quad (5)$$

2.2. Comprimento de onda associado ao elétron no microscópio eletrônico

Quando um elétron é acelerado por uma diferença de potencial no interior do microscópio eletrônico, pode-se considerar que a energia potencial (E_p) será totalmente convertida em energia cinética (E_c). Assim, desprezando os efeitos relativísticos, tem-se^{2,16}:

$$eV = \frac{m_e v^2}{2} \quad (6)$$

em que e é o módulo da carga do elétron ($1,602 \times 10^{-19}$ C), m_e é a sua massa de repouso ($9,108 \times 10^{-31}$ Kg) e v , a velocidade do elétron. Combinando a equação (5) com a equação (6) e substituindo os valores das constantes h , e e m_e , obtém-se λ :

$$\lambda = \sqrt{\frac{1,5}{V}} \text{ (nm)} \quad (7)$$

A equação (7) revela a dependência do comprimento de onda λ do elétron com o potencial de aceleração do microscópio eletrônico (V), isto é, λ diminuirá na medida em que aumenta o potencial de aceleração V . Assim, se o elétron for acelerado com uma tensão de 100 kV, o seu comprimento de onda será de 0,0038 nm⁷.

Usando a equação de Abbé (2), assumindo $NA = 1$ (comparável ao da objetiva de um microscópio óptico) e o comprimento de onda encontrado para a aceleração de 100 kV, a resolução do microscópio eletrônico será de 0,002 nm. Contudo, esse valor não poderá ser atingido, uma vez que existem outros fatores que influenciam na limitação da resolução de um microscópio, como a aberração esférica inerente às lentes magnéticas e da própria difração, conforme mostrado anteriormente.

Se o elétron for acelerado por uma grande diferença de potencial, tal que sua velocidade seja próxima à da luz c , sendo $c = 2,998 \times 10^8$ m/s,

os efeitos relativísticos não podem ser ignorados. A massa do elétron, então, crescerá quando comparada com sua massa de repouso, de acordo com a expressão de Lorentz^{2,16}:

$$m = \frac{m_e}{\sqrt{1 - \left(\frac{v}{c}\right)^2}} \quad (8)$$

A energia cinética do elétron não será mais dada pela equação (6), tendo que ser reescrita levando em consideração a equação (8):

$$eV = (m - m_e)c^2 \quad (9)$$

Combinando as equações (5), (8) e (9), tem-se a relação entre o comprimento de onda λ e o potencial de aceleração V , dada por:

$$\lambda^2 = \frac{h^2}{2eVm_e + e^2V^2/c^2} \quad (10)$$

Substituindo os valores das constantes h , e , m_e e c na relação na equação (10), obtém-se:

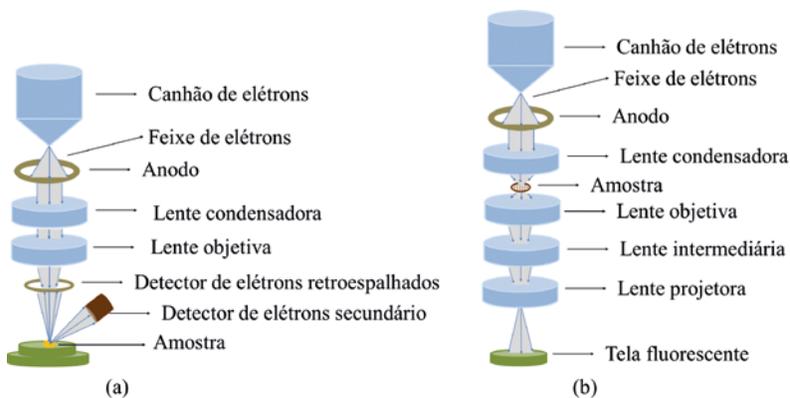
$$\lambda = \sqrt{\frac{1,5}{V + 10^{-6}V^2}} \text{ (nm)} \quad (11)$$

A equação (11) deve ser considerada para microscópios eletrônicos de média e alta voltagem. Para baixa voltagem, vale a equação (7).

3. Microscópio eletrônico

O microscópio eletrônico é composto por uma coluna mantida em alto vácuo, em que estão contidos um canhão de elétrons e um sistema de lentes magnéticas (condensadora e objetiva). No caso do microscópio eletrônico de transmissão (MET), ainda há as lentes projetora e intermediária. Na Figura 2(a), estão representados esquematicamente os componentes do microscópio eletrônico de varredura (MEV) e, na Figura 2(b), do microscópio eletrônico de transmissão (MET), que serão tratados em detalhes nas sessões seguintes.

Figura 2: Representação esquemática dos componentes do (a) MEV e (b) do MET



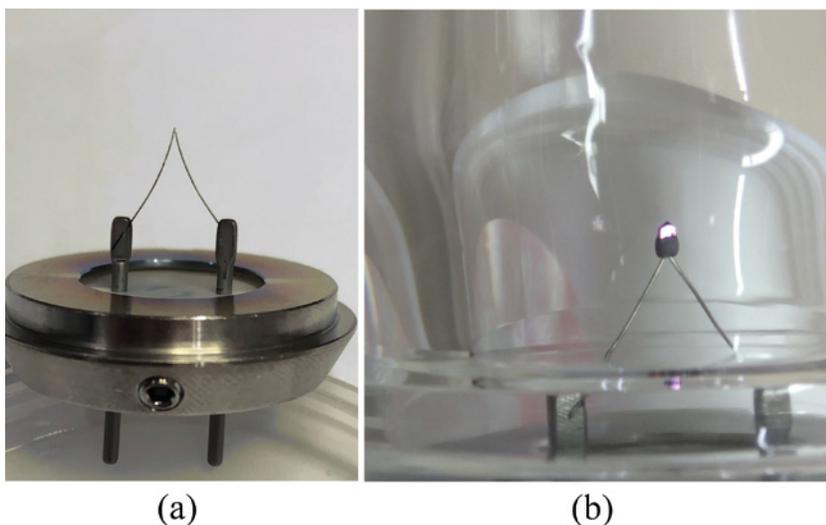
Fonte: elaborada pelos autores.

3.1. Tipos de fontes de elétrons

3.1.1. Fonte de emissão termiônica

A emissão termiônica corresponde ao escape de elétrons de uma superfície quando é fornecida energia suficiente para os elétrons vencerem a barreira de energia que os mantém presos na superfície. Essa energia é fornecida na forma de calor^{7,16}. Nos microscópios eletrônicos, são utilizadas duas fontes de emissão termiônica: o filamento de tungstênio e o cristal de hexaboreto de lantânio (LaB_6) (Figura 3).

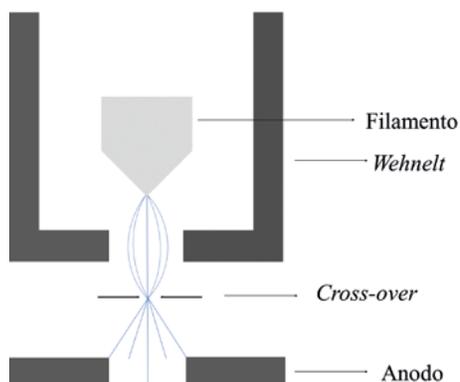
Figura 3: Filamento de (a) tungstênio e (b) cristal de hexaboreto de lantânio (LaB_6). Imagens obtidas no LabMic/UFG



Fonte: elaborada pelos autores.

O canhão de elétrons que usa esse tipo de emissão é constituído por três partes, um arranjo tipo triodo: um filamento, o *wehnelt* (uma capa metálica) e o anodo ligado ao fio terra, conforme Figura 4.

Figura 4: Representação do canhão de elétrons tipo triodo



Fonte: elaborada pelos autores.

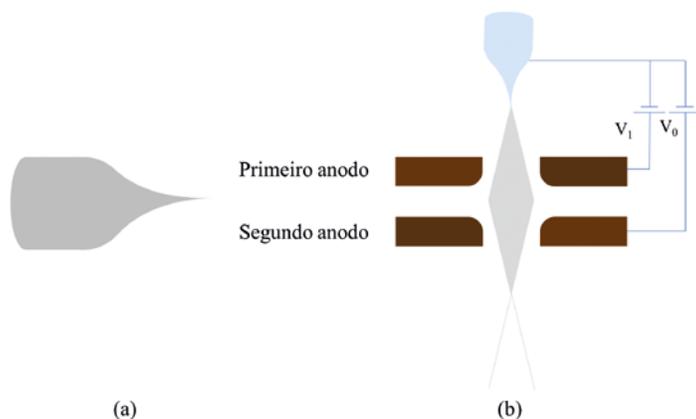
O filamento é aquecido pela passagem de uma corrente elétrica até a temperatura de ótima operação. Essa condição é conhecida como saturação do filamento, uma vez que o aquecimento adicional não arrancará mais elétrons da superfície deste, mas apenas diminuirá a sua vida útil. A partir desse ponto, o filamento começa a emitir elétrons e, para convergi-los no *cross-over*, é aplicada uma pequena diferença de potencial negativa no *wehnelt*, chamada de *bias*, conforme apresentado na Figura 4.

3.1.2. Fonte de emissão de campo (FEG)

Nas fontes de emissão de campo, *field emission electron gun (FEG)*, o filamento é um cristal de tungstênio com uma ponta muito fina, conforme mostrado na Figura 5(a). Essa condição favorece o “poder das pontas”, ou seja, a intensidade do campo elétrico aumenta em regiões pontiagudas, obedecendo à equação $\mathcal{E} = V/r$, em que \mathcal{E} é o módulo do campo elétrico gerado por uma diferença de potencial V e r , o raio de uma região esférica.

Na emissão de campo, a ponta do filamento atua como catodo e há, ainda, dois anodos (Figura 5(b)). O primeiro anodo gera um campo elétrico intenso, no qual os elétrons ganham energia suficiente para vencer a barreira de potencial que os prende no cristal, tornando-os livres. Esses elétrons livres são acelerados por outra diferença de potencial, que é aplicada pelo segundo anodo. Os campos combinados dos anodos atuam como uma lente eletrostática para produzir uma região de *cross-over*^{7,16}.

Figura 5: Esquema (a) da ponta do filamento tipo FEG e (b) do canhão de emissão de campo



Fonte: elaborada pelos autores.

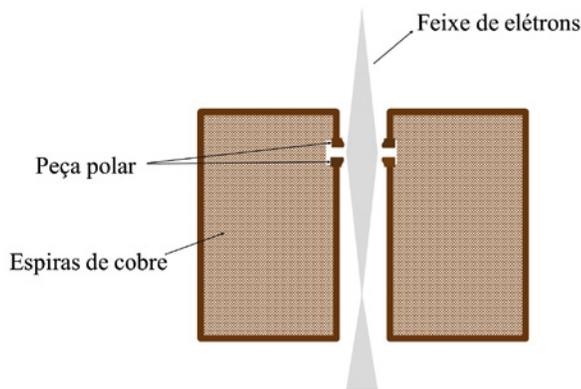
3.2. Sistema de lentes magnéticas

As lentes eletrônicas têm a função de convergir o feixe eletrônico na amostra e formar a imagem, podendo ser classificadas como eletrostática e magnética. O canhão de elétrons é considerado a lente eletrostática do microscópio.

Uma lente magnética é constituída por uma bobina com uma capa de ferro e peça polar, conforme esquematizado na Figura 6. Quando a corrente passa pelas espiras da bobina, um campo magnético é gerado, cuja função é a de convergir o feixe proveniente de um objeto em um ponto de imagem. Para ter lentes magnéticas mais potentes e com baixa distância focal, é necessário reduzir a região na bobina, na qual o campo é intenso. Para isso, é utilizada uma peça polar, que é um pequeno núcleo cilíndrico de ferro doce dentro da bobina. Nessa região, o campo magnético é mais intenso, permitindo o controle da ação de focalização da lente¹⁶.

Assim, as lentes magnéticas têm duas funções principais. A primeira é corrigir a trajetória dos elétrons desviados do eixo, por meio do campo magnético gerado na bobina e, também, permitir a ação focal da lente e maiores ampliações do objeto, já que campos intensos produzem distâncias focais menores.

Figura 6: Representação esquemática de uma lente magnética com capa de ferro e peça polar



Fonte: elaborada pelos autores.

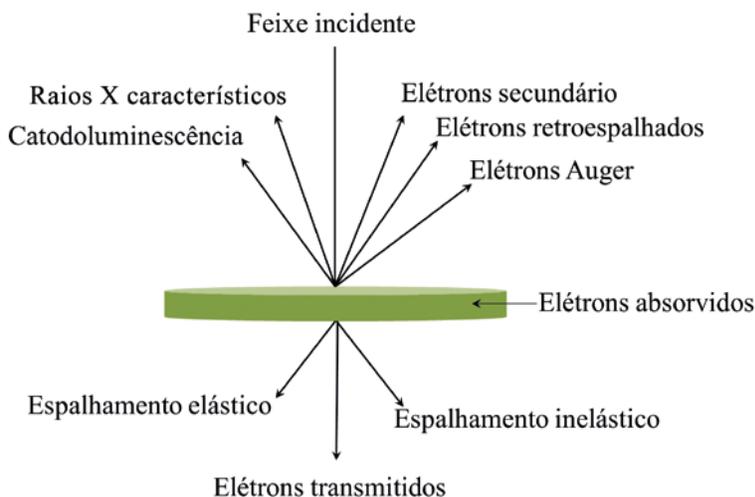
No microscópio eletrônico, pode-se ter as lentes condensadoras e a objetiva. Para o MET, ainda há as lentes intermediárias e a projetora.

A lente condensadora concentrará o feixe de elétrons na amostra em uma região a ser analisada. A objetiva foca a imagem variando a distância focal do feixe eletrônico. A intermediária magnificará a imagem a partir da imagem formada pela lente objetiva e a projetora produzirá a imagem final ampliada na tela fluorescente.

3.3. Interação do feixe com a amostra

Os elétrons do feixe eletrônico, ao incidir na amostra, interagirão com os átomos da amostra e, como consequência, ocorrerão vários tipos de espalhamentos simultaneamente, descritos na Figura 7. Cada espalhamento fornecerá alguma informação da amostra.

Figura 7: Representação esquemática dos tipos de espalhamento quando os elétrons do feixe principal interagem com os átomos da amostra



Fonte: elaborada pelos autores.

3.3.1. Espalhamento elástico

Os elétrons do feixe incidente podem interagir com o núcleo do átomo da amostra por meio de uma interação eletrostática (coulombiana). Esses elétrons podem mudar sua direção, ou seja, serem defletidos com ângulos maiores que 90° , podendo retornar pela mesma direção. Esse tipo de espalhamento é conhecido como espalhamento elástico, pois o elétron muda a direção quase sem perda de energia. Os elétrons desviados são conhecidos como elétrons retroespalhados ou *backscattered*^{7,12}.

No microscópio eletrônico de transmissão, os elétrons retroespalhados são responsáveis pelo contraste na imagem. Já no microscópio eletrônico de varredura, eles podem fornecer um contraste na imagem devido à diferença do número atômico dos átomos presentes na amostra, fornecendo, assim, informações sobre a composição química desta¹⁷.

3.3.2. Espalhamento inelástico

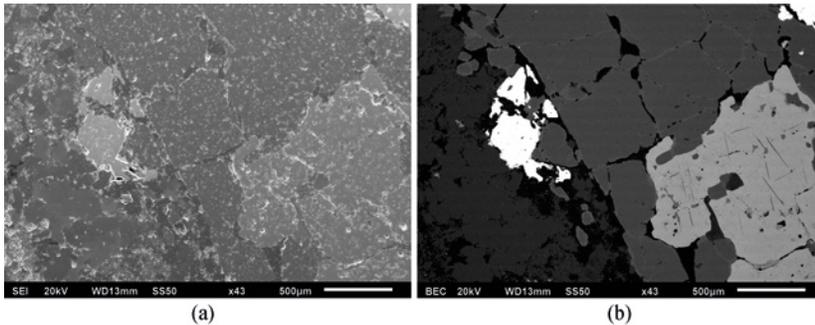
Os elétrons do feixe incidente também podem interagir com os dos átomos da amostra. Nessa situação, um elétron do feixe incidente pode fornecer energia para um elétron de um átomo da amostra ser ejetado, ionizando esse átomo, ou pode fornecer energia para o elétron sofrer uma transição eletrônica, saindo de um nível mais baixo para outro de mais alta energia. Esse tipo de espalhamento é conhecido como espalhamento inelástico, no qual o elétron do feixe incidente perde energia e tem sua direção desviada para baixos ângulos^{7,12}.

Nesse caso, a perda de energia fornece informação sobre um átomo da amostra, sendo a base para a identificação elementar em técnicas de microanálise, tais como a espectroscopia de perda de energia de elétrons (*EELS*) e a espectroscopia de energia dispersiva (*EDS*).

3.3.3. Elétrons secundários

Esses elétrons são gerados quando o elétron do feixe incidente interage com os elétrons do átomo da amostra, transferindo energia suficiente para ejetar o elétron do átomo. Esse elétron livre pode ser capturado por um átomo ionizado ou, se estiver próximo da superfície da amostra, pode dela escapar. Esses elétrons são conhecidos como secundários e fornecem informações sobre a superfície da amostra^{7,12}. Nas micrografias da Figura 8, pode ser visto um exemplo de imagem de elétrons secundários (*SEI*) e de elétrons retroespalhados (*BEC*), obtidas na mesma região da amostra.

Figura 8: Micrografia de lâmina delgada com (a) elétrons secundários (SEI) e (b) elétrons retroespalhados (BEC)



Fonte: Imagens cedidas por José Affonso Brod, da Unidade Acadêmica Especial de Ciências e Tecnologia da UFG.

3.3.4. Raios X característicos e elétrons Auger

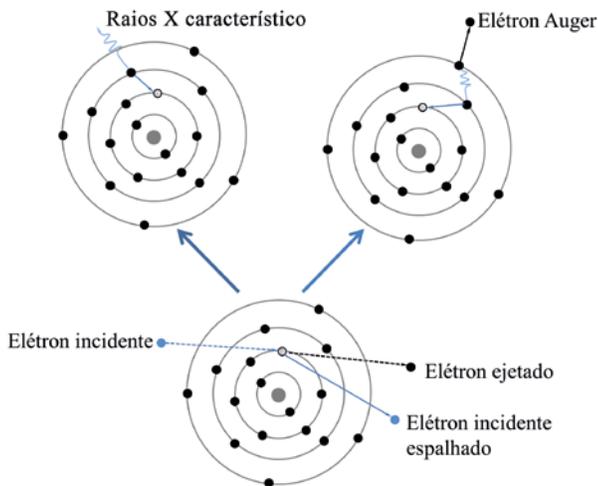
O átomo que ejetou um elétron ou que está em estado excitado não é mais estável. Nessa condição, um elétron de uma camada acima tende a preencher essa vacância para que o átomo retorne ao seu estado fundamental. Ao fazer essa transição, o elétron libera uma quantidade de energia cujo valor é igual à diferença entre os dois níveis de energia^{7,12}. Essa energia pode ser liberada de duas formas, conforme ilustrado na Figura 9:

- por meio de raios X característicos, que fornecem informações sobre a identificação do elemento que emitiu essa radiação específica, ou
- quando essa energia liberada é absorvida por outro elétron do átomo, fornecendo a energia necessária para ser ejetado, sendo conhecido como elétron Auger. Em geral, o elétron Auger é de baixa energia e fornece informação sobre a natureza química de uma camada fina da superfície da amostra.

3.3.5. Catodoluminescência

Alguns materiais têm a propriedade de emitir luz quando o feixe de elétrons incide sobre a amostra (Efeito de Catodoluminescência). Essa emissão será na faixa visível do espectro eletromagnético e pode fornecer informações sobre a recombinação de portadores de carga em defeitos da rede cristalina de material⁷.

Figura 9: Representação esquemática da ionização de um átomo e das transições dos elétrons com emissão de raios X característicos ou do elétron de Auger



Fonte: elaborada pelos autores.

4. Microscópio eletrônico de transmissão (MET)

O microscópio eletrônico de transmissão (MET) é uma poderosa ferramenta com alta resolução espacial para caracterização morfológica, estrutural e química de nanossistemas. Com os avanços de acessórios e o surgimento de novas técnicas, bem como o desenvolvimento de poderosos *softwares* de tratamento de dados e imagens, é possível obter informações de estruturas congeladas (criomicroscopia), fazer reconstrução tridimensional em alta resolução, realizar estudo da dinâmica de experimentos *in situ*, fazer mapeamento quantitativo químico, obter imagens com ultrarresolução, dentre outros^{4,5,13,18}.

A Figura 10 mostra o MET convencional com aceleração de 200 kV, que está instalado no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução da Universidade Federal de Goiás (LabMic/UFG).

Figura 10: Microscópio eletrônico de transmissão (MET) instalado no LabMic/UFG



Fonte: elaborada pelos autores.

Como visto, o feixe eletrônico é gerado no ganhão de elétrons, acelerado por uma diferença de potencial, que pode variar entre 100 kV e 1000 kV, por exemplo, dependendo da configuração do MET. O feixe formado imerge na coluna eletrônica com lentes magnéticas, responsáveis pela convergência dos feixes, formação e focalização da imagem.

O feixe é transmitido através da amostra, que deve ser fina, abaixo de 100 nm de espessura. Durante a passagem do feixe, surgem três diferentes interações dos elétrons do feixe transmitido com a amostra: os elétrons que são espalhados elasticamente, os elétrons que são espalhados inelasticamente e os elétrons que não sofrem nenhuma interação (elétrons transmitidos), conforme ilustrado na Figura 7.

Em amostras finas, há uma maior probabilidade de os elétrons do feixe transmitido não interagirem com os átomos da amostra^{17,19}. Nesse caso, a contribuição da espessura da amostra e da energia dos elétrons será expressa pelo parâmetro do livre caminho médio do elétron no material, que é a distância média percorrida por um elétron entre colisões.

O espalhamento elástico contribui para a formação da imagem de campo claro de alta resolução, sendo responsável pelo contraste no MET, pois podem ser bloqueados pela abertura da lente objetiva. Elétrons espalhados elasticamente podem sofrer desvios em grandes ângulos, contribuindo para a formação de imagens de campo escuro por meio de uma técnica conhecida como detector anular de grande ângulo (*high angle anular dark field - HAADF*), formando a imagem no microscópio eletrônico de transmissão-varredura (*STEM*)^{19,20}.

No espalhamento inelástico, a perda de energia é característica de cada tipo de átomo, fornecendo informações sobre a composição da amostra pela técnica de microanálise conhecida como Espectroscopia de perda de energia de elétrons (*EELS*).

4.1. Formação da imagem no microscópio eletrônico de transmissão (MET)

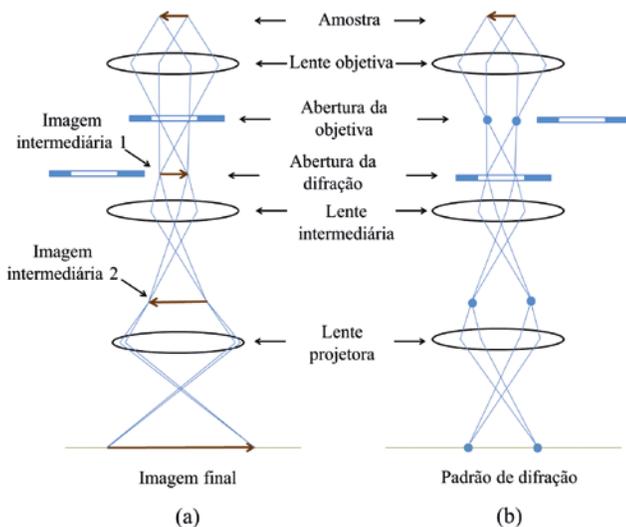
A geometria dos raios envolvidos na formação da imagem no microscópio eletrônico de transmissão está apresentada na Figura 11(a). Depois que o feixe atravessa a amostra, a primeira lente é a objetiva, que fornecerá uma imagem ampliada do objeto (imagem da intermediária 1). A lente intermediária fornece uma segunda imagem ampliada (imagem da intermediária 2). Por fim, a lente projetora fornece a imagem ampliada final na tela, denominada de imagem de campo claro (*bright field*)⁷.

Os elétrons do feixe transmitido sofrem difração ao interagirem com amostras cristalinas. O padrão de difração aparece na forma de *spots* (pontos), conforme ilustrado na Figura 11(b), e está focalizado no plano focal posterior da lente objetiva²¹. Cada *spot* corresponde a um espaçamento atômico específico (um plano), fornecendo informações sobre a orientação, os arranjos atômicos e as fases presentes na área analisada.

É importante ressaltar que todos os espalhamentos descritos acontecem ao mesmo tempo e, assim, alguns raios difratados seguem o mesmo caminho do feixe na formação da imagem de campo claro. Portanto, é possível selecionar o tipo de observação por meio do uso de aberturas.

No MET, tem-se a abertura da condensadora, responsável por bloquear os elétrons que estão desviados com grandes ângulos do feixe principal, e a abertura da objetiva, responsável pelo contraste na imagem e pela seleção da imagem de campo claro ou campo escuro (*dark field*). A imagem de campo escuro é formada apenas pelos raios difratados pela amostra, fornecendo informação de cristalinidade.

Figura 11: Representação da geometria dos raios para formação de imagens no MET (a) para formação da imagem da amostra e (b) para formar a imagem do padrão de difração de elétrons



Fonte: elaborada pelos autores.

4.2. Exemplos de informações obtidas no MET

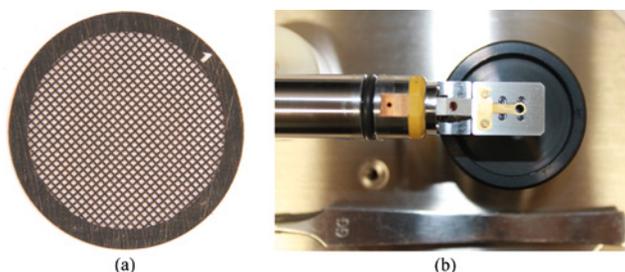
Para obter uma informação confiável e conclusiva, quer seja por microscopia eletrônica de transmissão, quer seja por microscopia eletrônica de varredura, é importante conhecer a amostra ou ter informações prévias sobre a composição, a estrutura, a homogeneidade ou os possíveis defeitos. Além disso, definir a forma como a amostra será preparada é essencial para obter sucesso na análise e resultados satisfatórios.

Alguns tipos de amostras necessitam de preparos especiais. Amostras biológicas, por exemplo, passam por uma série de etapas para garantir que tenham suas características preservadas e possam resistir ao alto vácuo no microscópio, bem como ao intenso feixe de elétrons.

Hoje, há uma variedade de técnicas e equipamentos que auxiliam na preparação de amostras. Em geral, a etapa de preparação para visualização no MET envolve métodos de fixação para preservar as

estruturas celulares e intracelulares, que podem ser químicos, por meios de reagentes, ou físicos, por meios criogênicos. Na sequência, há a desidratação, a inclusão em resina e os cortes ultrafinos (entre 50 e 70 nm). Os filmes ultrafinos são colocados em uma grade (*grid*), conforme mostrado na Figura 12(a). A última etapa é a contrastação, a qual utiliza sais de metais pesados para melhorar o contraste, uma vez que a composição da amostra biológica é de elementos de baixo número atômico^{7,21}. Após a secagem, a amostra está pronta para ser colocada no porta-amostras (Figura 12(b)).

Figura 12: (a) Imagem da grade de 300 mesh, registrada no microscópio óptico Axio Zoom.V16 da Zeiss. (b) Porta-amostras do MET do LabMic/UFG



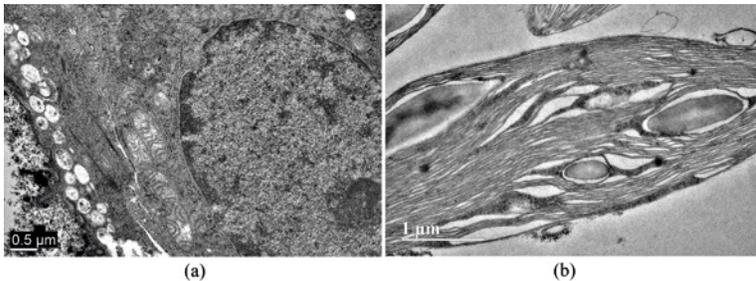
Fonte: elaborada pelos autores.

Em seguida, serão apresentados alguns exemplos de micrografias de análises realizadas no microscópio eletrônico de transmissão (MET), Jeol, JEM-2100, instalado no LabMic/UFG, operando em 100 kV.

Nas micrografias das Figuras 13(a) e 14(b), observam-se a morfologia de diferentes células animais e a presença de diversas organelas na região do citoplasma perinuclear. Ainda na Figura 14(b), é possível verificar a presença de aglomerados de nanopartículas de ferrita, indicadas pelas setas. Esse tipo de análise é importante na nanobiotecnologia, pois confirma a presença das nanopartículas no interior da célula; também fornece informações sobre as mudanças morfológicas causadas pela entrada das nanopartículas na célula, como um fármaco.

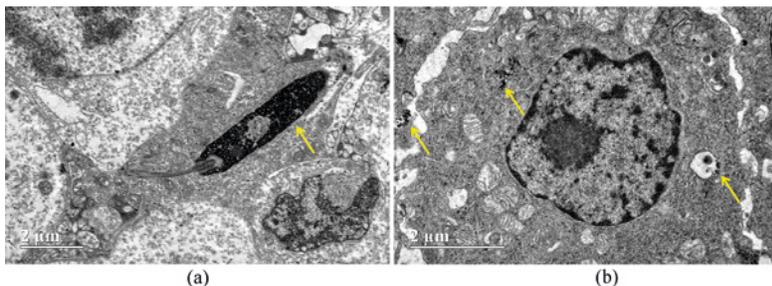
A micrografia da Figura 13(b) apresenta um exemplo de ultraestrutura de cloroplastos presente no interior de células vegetais. Já na Figura 14(a), a micrografia mostra a ultraestrutura de um espermatozoide, indicada pela seta, dentro do testículo de uma arara-canindé (*Ara ararauna*).

Figura 13: (a) Micrografia da região do citoplasma perinuclear de célula prostática de gerbilo (*Meriones unguiculatus*)



Fonte: Imagem cedida por Fernanda Cristina Alcântara dos Santos e Manoel Francisco Biancardi, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. (b) Micrografia de cloroplastos de *Aechmea bromeliifolia* (Rudge) Baker (Bromeliaceae) germinada *in vitro*. Imagem cedida por Letícia de Almeida Gonçalves e Elienai Cândida e Silva, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG.

Figura 14: (a) Micrografia do testículo de uma arara-canindé (*Ara ararauna*). Em destaque, a ultraestrutura do espermatozoide (indicada pela seta). Imagem cedida por Karina Simões, do Instituto de Ciências Biológicas da UFG. (b) Micrografia de células macrófagos com a presença de aglomerados de nanopartícula de ferrita (indicados pela seta)



Fonte: Imagem cedida por André Côrrea Amaral e Anielle Carvalho Bandeira (*in memoriam*), do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG.

Nas ciências de materiais, algumas amostras não precisam de procedimentos especiais de preparo, como as nanopartículas (metálicas, cerâmicas etc.), os nanotubos, dentre outros. O preparo desse tipo de amostra é relativamente simples, o material é suspenso e uma alíquota é depositada na grade. Após a secagem, a análise é realizada.

Para determinadas amostras, o preparo requer o uso de um conjunto de técnicas de polimentos e desbastes, incluindo o uso do *Focused Ion Beam (FIB)*. O *FIB* é um feixe de íons que, quando focalizado, pode modificar diretamente a superfície da amostra, por meio de um processo de *sputtering*. Ao controlar a energia e a intensidade do feixe de íons, é possível remover material da superfície ou produzir camadas com precisão nanométrica, até que a amostra fique com a espessura adequada para a visualização no MET.

As Figuras de 15 a 19 mostram alguns exemplos de micrografias obtidas no MET, Jeol, JEM-2100, instalado no LabMic/UFG, operando em 200 kV.

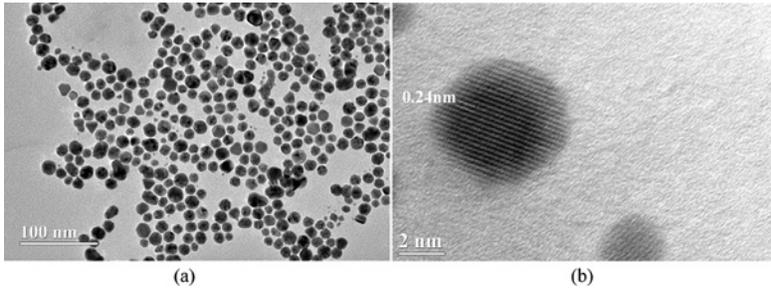
A Figura 15(a) apresenta a morfologia de nanopartículas de ouro (Au), sendo possível determinar a dispersão de tamanho pela contagem de diâmetros. A imagem de alta resolução fornece informações sobre a cristalinidade e a distância interplanar, conforme indicado na Figura 15(b).

Como mencionado, o MET também fornece a imagem por difração de elétrons. Na Figura 16(b), está apresentado o padrão de difração de elétrons das nanopartículas da Figura 16(a), sendo possível determinar a distância interplanar de diferentes planos e fazer a indexação com os índices hkl diretamente do padrão de difração. Já a Figura 17(b) mostra a difração de elétrons de um nanocristal de sílica (SiO_2), e, na Figura 17(a), os planos cristalinos de uma região do nanocristal.

A Figura 18(b) mostra a imagem de campo escuro de uma matriz polimérica (amorfa), cujos pontos brilhantes indicam a presença de material cristalino, que são nanopartículas de níquel. Na imagem de campo claro, não se pode observar a distribuição das nanopartículas, uma vez que elas estão em todo o volume do polímero, o que dificulta a visualização das nanoestruturas.

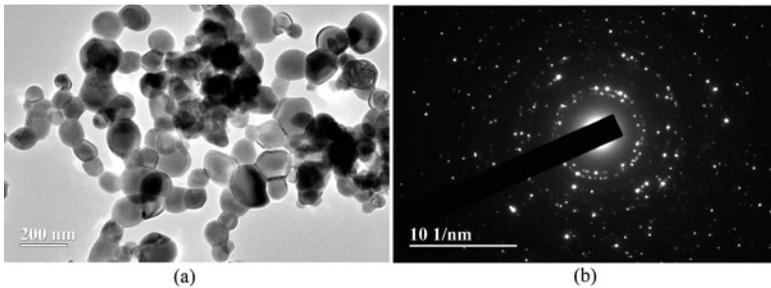
Um dos desafios da atualidade é compreender e melhorar o transporte de fármacos (*drug delivery*). Para isso, o estudo de novos sistemas é essencial para maximizar os efeitos e a eficácia dos fármacos. A Figura 19 mostra um tipo de sistema polimérico que tem sido estudado para as aplicações de transporte de fármacos. Esse tipo de amostra requer um preparo especial, com o uso de contrastes à base de sais de metais pesados, por meio de uma técnica conhecida como *contrastação negativa* (*negative stain*).

Figura 15: (a) Micrografia de nanopartículas de ouro (Au) e (b) alta resolução de uma nanopartícula de ouro



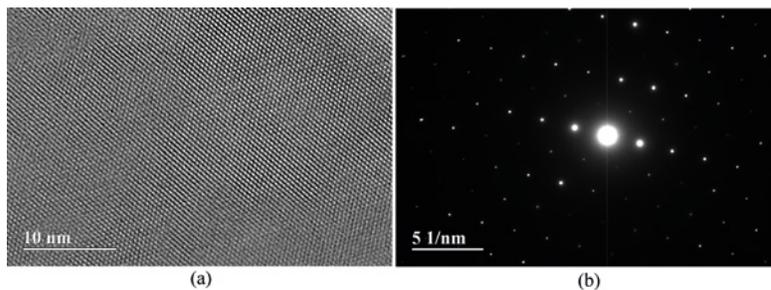
Fonte: Imagens cedidas por Emília Celma de Oliveira Lima, do Instituto de Química da UFG.

Figura 16: Micrografia de nanopartículas de óxido de zinco dopado com gadolínio (a) com campo claro e (b) padrão de difração de elétrons de uma área selecionada



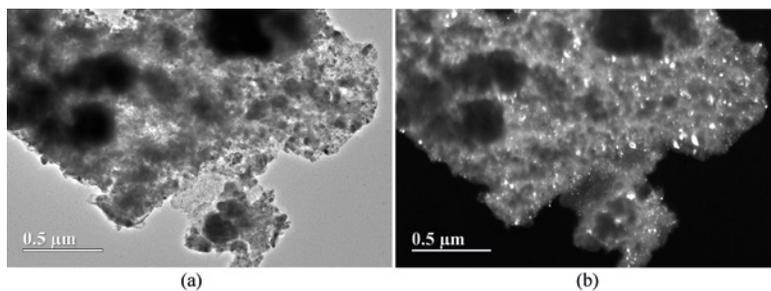
Fonte: Imagens cedidas por Adolfo Franco Júnior, do Instituto de Física da UFG.

Figura 17: (a) Micrografia de alta resolução de um nanocrystal de sílica (SiO_2) e (b) o padrão de difração de elétron de uma área selecionada no nanocrystal



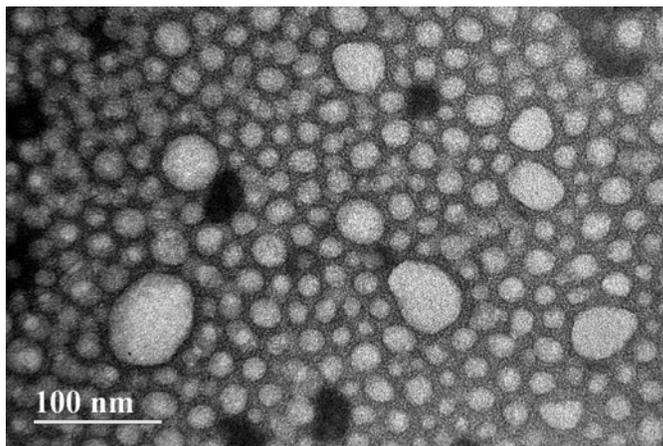
Fonte: elaborada pelos autores.

Figura 18: Micrografia de uma matriz polimérica com a presença de nanopartículas de níquel com (a) campo claro e (b) campo escuro



Fonte: Imagens cedidas por Marco Antonio Morales Torres, do Departamento de Física Teórica e Experimental da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN).

Figura 19: Micrografia de nanocápsula polimérica (micela) com fármaco encapsulado



Fonte: Imagem cedida por Emília Celma de Oliveira Lima, do Instituto de Química da UFG.

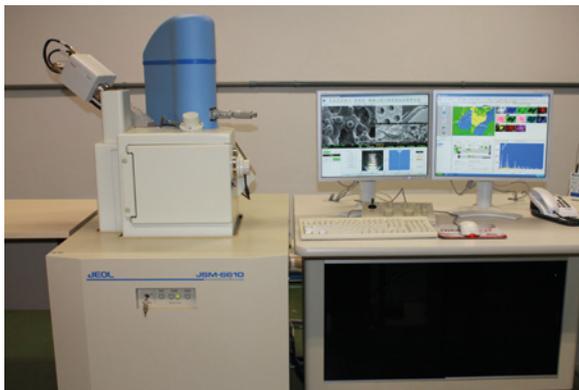
5. Microscópio eletrônico de varredura (MEV)

O MEV é comumente utilizado para a análise de amostras grandes e espessas, a fim de obter informações sobre as características da superfície e de sua identificação química. Nos equipamentos convencionais, a resolução é da ordem de 3 nm e possui uma grande profundidade de foco, fornecendo uma impressão de imagem tridimensional. Os elétrons são acelerados com uma energia entre 0,5 keV e 30 keV. A Figura 20 mostra o MEV convencional instalado no Laboratório Multiusuário de Microscopia de Alta Resolução da Universidade Federal de Goiás (LabMic/UFG).

O MEV-FEG, conhecido assim por possuir fonte de emissão de campo (*field emission electron gun*), apresenta um feixe com alta densidade eletrônica e resolução superior à do MEV convencional. Com avanços

no sistema de detecção e aquisição de imagens, além dos demais acessórios, principalmente para baixa tensão (abaixo de 100 eV - MEV de ultrabaixa voltagem), o MEV-FEG tem se tornado uma poderosa ferramenta para o estudo de materiais orgânicos e inorgânicos em escalas nanométricas¹.

Figura 20: Microscópio eletrônico de varredura (MEV) instalado no LabMic/UFG



Fonte: Elaborada pelos autores.

Os microscópios de alta resolução e as técnicas associadas aumentam a extensão de aplicabilidade desses equipamentos, desde a pesquisa em materiais até as ciências biológicas. Por exemplo, podem ser utilizados em estudos de polímeros e catalisadores, em nanotecnologia e nanobiotecnologia, estudos na indústria farmacêutica em sistemas de transporte de fármacos, por exemplo. Ainda há a possibilidade de analisar amostras com baixa temperatura em sistemas biológicos hidratados, com alta resolução espacial, obtendo informações morfológicas e de ultraestrutura¹.

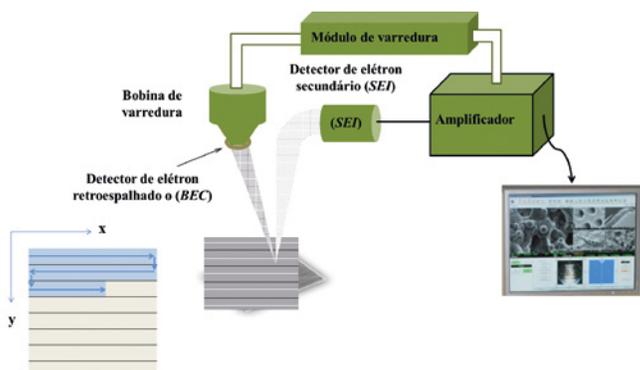
5.1. Funcionamento do MEV

Após o feixe ser formado e acelerado pela tensão de aceleração, ele é condensado pela primeira lente condensadora e novamente por uma segunda lente condensadora, reduzindo ainda mais o diâmetro do feixe. Assim como no MET, o MEV também possui as aberturas da condensadora e objetiva, com a finalidade de bloquear os elétrons que

estão desviados com grandes ângulos. Por fim, a lente objetiva forma um feixe ainda mais fino e um conjunto de bobinas o deflete, iniciando a varredura. O diâmetro do feixe final será entre 2 nm e 10 nm para o MEV convencional, e 1 nm para o MEV-FEG^{1,2,17}.

A Figura 21 mostra um esquema do sistema de varredura. O feixe é defletido por um conjunto de bobinas que varre a amostra em linhas, indicado em detalhe no canto inferior esquerdo da Figura 21. Conforme o feixe varre a amostra, os elétrons secundários são gerados e um detector os coleta, amplifica o sinal e gera a imagem. A magnificação da imagem será dada pela relação entre o tamanho da área varrida em relação ao tamanho da imagem que aparece no monitor. Portanto, quanto maior a magnificação, menor será a área varrida e, consequentemente, a deflexão do feixe sobre a amostra.

Figura 21: Esquema do sistema de varredura no MEV



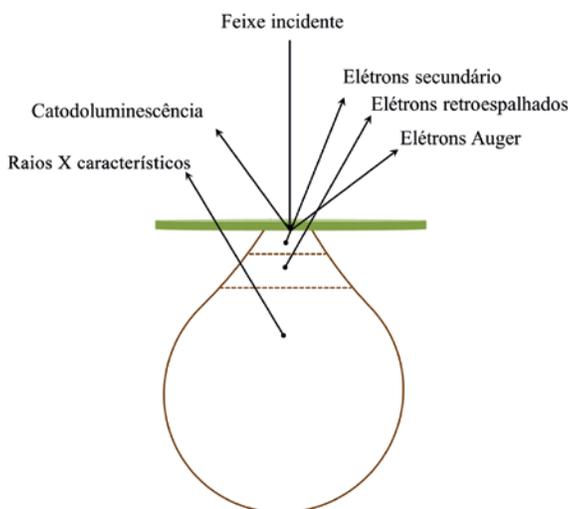
Fonte: elaborada pelos autores.

Como visto anteriormente, quando o feixe eletrônico incide na amostra, os elétrons são espalhados elasticamente ou inelasticamente. Uma pequena fração desse espalhamento é desviada com ângulos maiores que 90° e com pequena perda de energia. Portanto, há uma maior probabilidade de os elétrons deixarem a amostra e serem coletados pelo sistema de detecção. No caso do espalhamento inelástico, os elétrons não terão energia suficiente para deixar a amostra e podem

ser absorvidos pelos átomos do material. Se for um metal, os elétrons livres contribuirão para a banda de condução.

A profundidade de penetração do feixe eletrônico produz o volume de interação, onde as interações ocorrem, durante a varredura do feixe sobre a amostra. Esse volume, normalmente, tem a forma de uma “pera”, conforme ilustrado na Figura 22, e a profundidade diminui com o aumento do número atômico. Para uma aceleração de feixe de 1 keV, a profundidade de penetração do carbono será de 50 nm, e menos de 10 nm para o ouro¹⁷.

Figura 22: Representação esquemática do volume de interação e origem dos sinais



Fonte: elaborada pelos autores.

5.2. Exemplos de informações obtidas no MEV

As micrografias das Figuras 23 a 25 foram obtidas no MEV, Jeol, JSM-6610 do LabMic/UFG, e ilustram alguns exemplos de informações obtidas usando o MEV convencional.

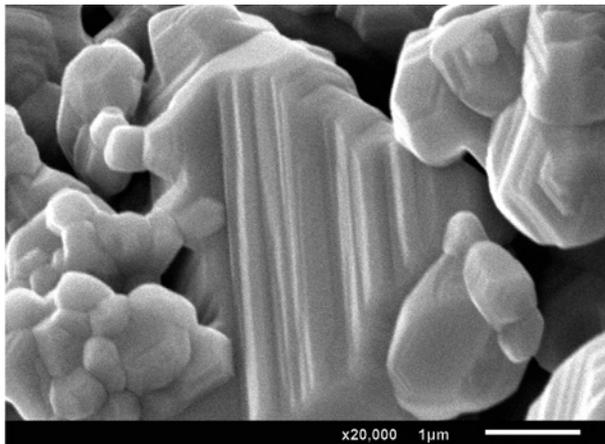
Na Figura 23, verifica-se a morfologia de particulados cerâmicos, revelando o crescimento lamelar do grão.

Uma distribuição de aglomerados de óxidos de metais de transição para catalisadores e informações morfológicas sobre a formação de precipitados da pasta de cimento hidratada são apresentadas nas Figuras 24(a) e 24(b).

Para algumas amostras, é possível obter a dispersão de tamanho, informações sobre aglomeração e morfologia de nanopartículas, conforme apresentado na Figura 25(a), para nanopartículas de óxido de nióbio, e na Figura 25(b), para nanopartículas de cromita.

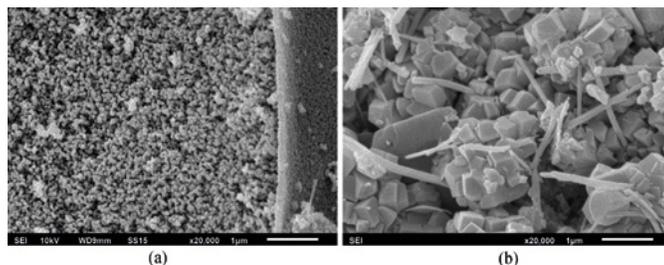
Para fins de comparação, a Figura 26 apresenta a micrografia de nanopartícula de ouro, com diâmetro médio de 10 nm, obtida no MEV-FEG, JEOL JSM 7100F, do Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI).

Figura 23: Micrografia de particulados cerâmicos



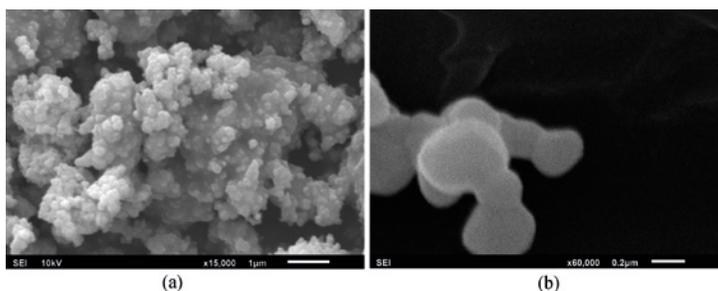
Fonte: Imagens cedidas por Adolfo Franco Júnior, do Instituto de Física da UFG.

Figura 24: (a) Micrografia de óxidos de metais de transição para catalisadores. Imagem cedida por Maria Rita de Cássia Santos, do Departamento de Química do Campus Catalão da UFG. (b) Micrografia da superfície fraturada de um concreto, destacando alguns compostos precipitados da pasta de cimento hidratada



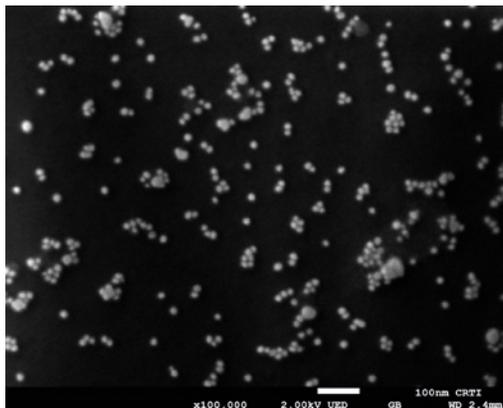
Fonte: Imagem cedida por Oswaldo Cascudo e Helena Carasek, da Escola de Engenharia Civil e Ambiental da UFG.

Figura 25: (a) Micrografia de nanopartículas de óxido de nióbio. Imagem cedida por Christian Gonçalves Alonso, do Instituto de Química da UFG. (b) Micrografia de nanopartículas de cromita



Fonte: Imagem cedida por Jesiel Freitas Carvalho, do Instituto de Física da UFG.

Figura 26: Micrografia de nanopartículas de ouro (Au) em alta resolução, obtida no MEV-FEG, JEOL JSM 7100F do CRTI



Fonte: Imagens cedidas por Emília Celma de Oliveira Lima, do Instituto de Química da UFG.

6. Microanálise analítica

Um aspecto importante no estudo de materiais é a determinação da relação entre a microestrutura e as propriedades macroscópicas físico-químicas. A microestrutura determina muitas propriedades de interesse e sua formação depende basicamente da composição química e da síntese dos materiais²³. Nesse sentido, as microscopias eletrônica de transmissão e de varredura são importantes ferramentas, pois combinam imagens morfológicas de alta resolução com análises químicas, qualitativa e quantitativa, com alta resolução espacial.

Na microanálise analítica, há dois tipos de técnicas: a microanálise de raios X e a espectroscopia de perda de energia de elétrons. A primeira pode ser associada tanto ao MEV como ao MET e, a segunda somente ao MET.

6.1. Microanálise de raios X

Como visto anteriormente, para que um átomo excitado retorne ao seu estado fundamental, é necessário que um elétron sofra uma transição, liberando uma quantidade de energia cujo valor é igual à diferença entre os dois níveis de energia. Essa energia pode ser liberada como raios X característicos, que fornecem informações sobre a identificação do elemento que emitiu essa radiação específica. Em outras palavras, esse tipo de análise permite identificar os átomos presentes na amostra.

Portanto, a microanálise de raios X utiliza os raios X característicos emitidos de uma microrregião da amostra quando um feixe eletrônico incide sobre ela. Há duas formas de detecção dos raios X característicos:

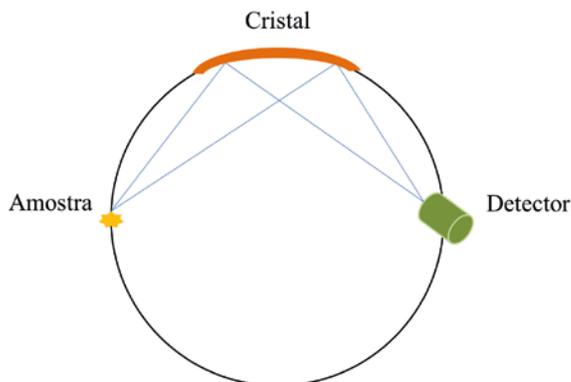
- Espectroscopia por dispersão de comprimento de onda (*Wavelength dispersive spectroscopy – WDS*)

Os raios X característicos são difratados por um cristal analisador, conforme representado na Figura 27. O cristal age como uma grade de difração tridimensional e reflete os raios X (fortemente difratados) quando um comprimento de onda λ dos raios X satisfaz a equação de Bragg¹⁷, dada por:

$$n\lambda = 2d\sin\theta \quad (12)$$

em que n é a ordem da reflexão, θ é o ângulo entre os raios X incidentes e um plano cristalino de distância d do cristal. Os raios difratados pelo cristal são coletados por um detector, que mede a intensidade dos raios X em função do comprimento de onda λ .

Figura 27: Representação da geometria do espectrômetro por dispersão de comprimento de onda



Fonte: elaborada pelos autores.

- Espectroscopia por energia dispersiva (*Energy dispersive spectroscopy - EDS*)

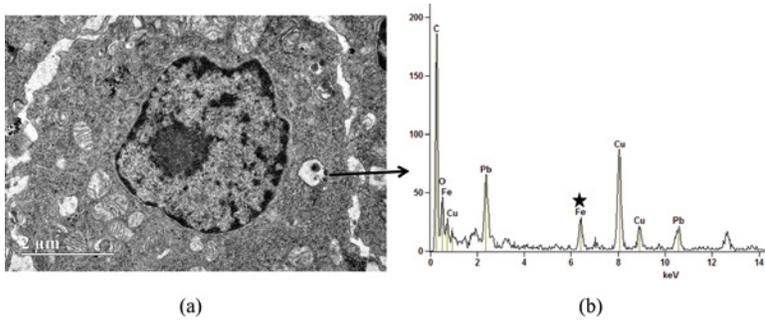
Os raios X característicos são coletados por um detector de estado sólido. No detector, os raios X incidentes são separados por suas energias utilizando os picos de corrente gerados por eles no detector⁷. O resultado é apresentado na forma de espectro em função da energia em keV.

Nas Figuras 28 e 29, observam-se alguns exemplos de análises pontuais por EDS. Os espectros foram obtidos com o detector de EDS acoplado ao MET, Figura 28, e no MEV, Figura 29.

É possível a análise em amostras biológicas, como visto na Figura 28(a). O pico de interesse é o ferro (Fe), que confirma a presença de nanopartículas de ferrita no interior da célula, conforme indicado (estrela) no espectro da Figura 28(b).

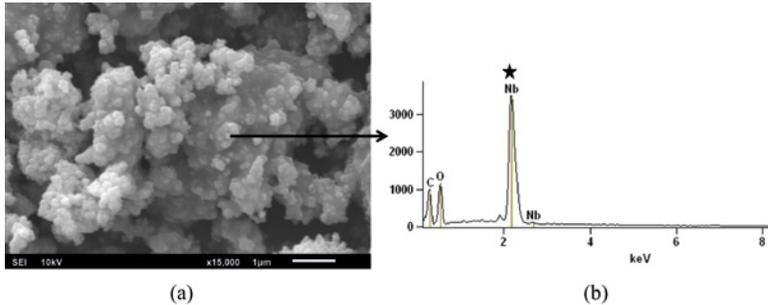
Na Figura 29, o espectro indica a presença de nióbio (Nb), Figura 29(a), devido à composição da amostra, nanopartículas de óxido de nióbio.

Figura 28: (a) Micrografia de células macrófagos (Figura 14(a)). (b)



Fonte: Imagem cedida por André Côrrea Amaral e Anielle Carvalho Bandeira (*in memoriam*), do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública da UFG.

Figura 29: (a) Micrografia de nanopartículas de óxido de nióbio (Figura 25(a)). (b) Espectro de EDS indicando a de nióbio (Nb) (estrela)

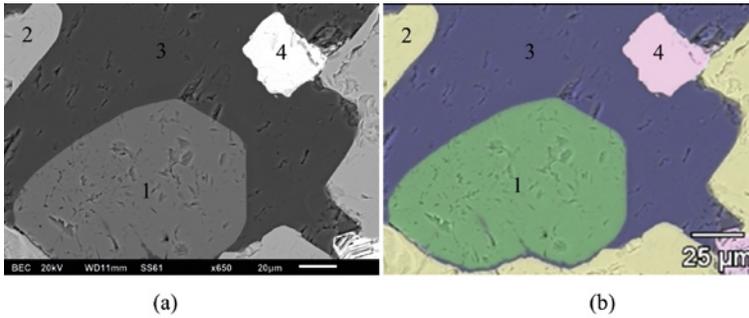


Fonte: Imagem cedida por Christian Gonçalves Alonso, do Instituto de Química da UFG.

Além de análises pontuais, o EDS fornece mapa de identificação elementar, no qual é atribuída uma cor para cada elemento mapeado. Para cada região (1, 2, 3 e 4) da Figura 30(a), há um mapa e um espectro com a identificação dos elementos, indicando a distribuição do elemento; posteriormente, os mapas individuais são superpostos, fornecendo

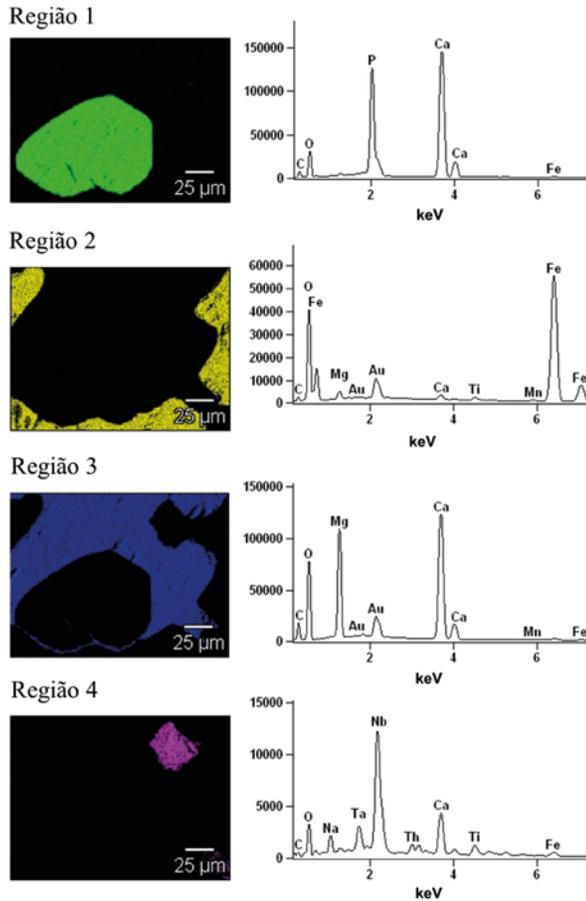
a imagem da Figura 30(b). A Figura 31 mostra as regiões mapeadas referentes à Figura 30, com os respectivos espectros de EDS.

Figura 30: (a) Micrografia de lâmina delgada. (b) Superposição dos mapas de identificação qualitativa elementar de cada região



Fonte: Imagens cedidas por José Affonso Brod, da Unidade Acadêmica Especial de Ciências e Tecnologia da UFG.

Figura 31: Regiões mapeadas referentes à Figura 30, com os respectivos espectros de EDS

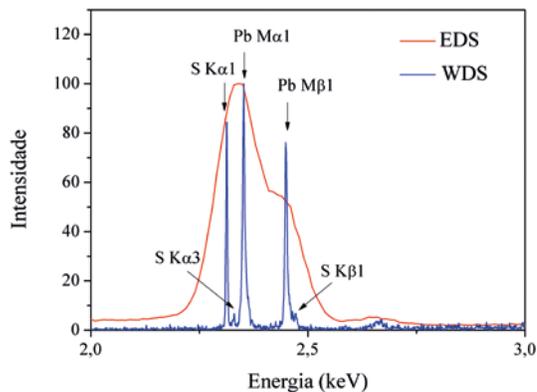


Fonte: Imagens cedidas por José Affonso Brod, da Unidade Acadêmica Especial de Ciências e Tecnologia da UFG.

As técnicas de *EDS* e *WDS* fornecem a mesma informação, diferenciando-se em algumas características operacionais. A espectroscopia por energia dispersiva (*EDS*) detecta vários elementos ao mesmo tempo, permitindo uma análise relativamente rápida. Há apenas um detector para coletar o sinal e, comumente, há a superposição de picos devido à sua resolução espectral. Já na espectroscopia por dispersão de

comprimento de onda (*WDS*), há mais de um detector e a identificação elementar é realizada com um elemento por vez, aumentando o tempo de análise. Contudo, a resolução espectral é superior à do *EDS*, reduzindo a superposição de picos. A Figura 32 apresenta um exemplo de superposição no espectro de *EDS* (curva em vermelho) entre os elementos enxofre (S), na transição $K\alpha_1$, e chumbo (Pb), na transição $M\alpha_1$. Essa superposição se deve à larga resolução espectral do *EDS*. Já no espectro *WDS* (curva em azul), por ele ter resolução espectral superior à do *EDS*, aparecem picos definidos e separados. Ambos os espectros foram obtidos da mesma região da amostra, com as mesmas condições de medidas e realizados na microsonda eletrônica Jeol JXA-8230 do Centro Regional para o Desenvolvimento Tecnológico e Inovação (CRTI).

Figura 32: Espectro de *EDS*, curva em vermelho, e na curva em azul o espectro *WDS*



Fonte: Imagens cedidas pelo CRTI.

6.1. Espectroscopia de perda de energia de elétrons (Electron energy-loss spectroscopy - EELS)

A espectroscopia de perda de energia de elétrons (*EELS*) analisa os elétrons do feixe eletrônico após sua interação com a amostra. Esses elétrons carregam informações de número atômico na forma da quantidade de energia que eles transferiram para a amostra, tanto de átomos leves como pesados.

Essa espectroscopia só é permitida no MET, pois é necessário que as amostras sejam finas, com espessura em torno do livre caminho médio para uma interação inelástica do elétron do feixe eletrônico com átomos do material. Nessa condição, o elétron interage uma única vez e, portanto, a perda de energia após a interação corresponderá a alguma energia necessária para fazer um elétron sofrer uma transição ou ser ejetado do átomo. A análise do espectro de perdas de energia permite identificar os átomos da amostra.

7. Outras técnicas

Com os avanços das técnicas de preparação de amostras, tanto materiais inorgânicos quanto biológicos, melhorias no sistema de detecção e no tratamento de dados têm contribuído para o surgimento de diferentes técnicas com alta resolução espacial, dentro da microscopia eletrônica, sendo possível destacar as seguintes técnicas:

Tomografia eletrônica: permite a análise de amostras entre 0,2 μm e 2 μm no MET, partindo da aquisição e do processamento de uma série de imagens com diferentes ângulos. O volume de imagens será recombinado em uma imagem tridimensional, permitindo extrair informações de planos individuais, com alta resolução, sem que haja sobreposição de estruturas. Na prática, tem-se uma reconstrução tridimensional a partir de retroprojeções bidimensionais da amostra em diversos ângulos²⁴.

Criotransmissão: permite analisar amostras congeladas no MET, como proteínas, lipossomas, nanocápsulas poliméricas, entre outras. As amostras são preparadas por meio de técnicas criogênicas e analisadas no MET usando um porta-amostras com nitrogênio líquido para manter as amostras congeladas.

Microscopia eletrônica de varredura de duplo feixe: combina o MEV com o feixe de íons focalizados (*FIB*). O feixe de íons, ao interagir com a amostra, desbasta uma fina camada, permitindo o estudo de estruturas internas e o imageamento em cortes seriados, resultando em uma série de imagens que podem ser recombinadas para formar uma imagem tridimensional²⁵.

Portanto, a microscopia eletrônica oferece amplas possibilidades para a compressão da natureza de nanossistemas, permitindo a obtenção de informações sobre as propriedades morfológicas e físico-químicas de nanocomponentes individuais.

8. Referências

1. LIU, Jingyue. High-resolution scanning electron microscopy. In: YAO, Nano; WANG, Zhong L. **Handbook of microscopy for nanotechnology**. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, 2005.
2. GOODHEW, Peter J.; HUMPHREYS, John; BEANLAND, Richard. **Electron microscopy and analysis**. 3.ed. London: Taylor & Francis, 2001.
3. ASAHINA, Shunsuke et al. High-resolution low-voltage scanning electron microscope study of nanostructured materials. **Microscopy and Analysis**, Nanotechnology Issue, 2012.
4. CHARURVEDI, Shalini; DAVE, Pragnesh N. Microscopy in Nanotechnology. In: MÉNDEZ-VILAS, A. **Current microscopy contributions to advances in science and technology**. [S.l.]: Formatex Research Center, 2012.
5. SAWADA, Hidetaka et al. Super high resolution imaging with atomic resolution electron microscope of JEM-ARM300F. **JEOL News**, v. 49, n. 1, 2014.
6. RUSKA, Ernest. The development of the electron microscope and of electron microscopy. **Nobel lecture**, december 8, 1986.
7. FARINA, Marcos. **Uma introdução à microscopia eletrônica de transmissão**. Rio de Janeiro: Livraria da Física, 2010.
8. SOUZA, Wanderley. Microscopia ótica básica: aspectos da ótica geométrica e conceito de resolução. In: SOUZA, Wanderley. **Microscopia óptica: fundamentos e aplicações às ciências biomédicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2010.

9. NUSSENZVEIG, Herch Moysés. **Curso de Física básica 4**. São Paulo: Blucher, 1998.
10. SEARS, Zemansky. **Física IV: ótica e física moderna**. 12. ed. [S.l.]: Addison Wesley, 2009.
11. EISBERG, Robert; RESNICK, Robert. **Física Quântica**. 14. ed. Rio de Janeiro: Editora Campus, 1979.
12. FARINA, Marcos; LINS, Ulysses. Introdução à microscopia eletrônica analítica: aplicações biológicas. In: SOUZA, Wanderley. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.
13. JIN, Lei et al. Atomic resolution imaging of YAlO_3 : Ce in the chromatic and spherical aberration corrected PICO electron microscope. **Ultramicroscopy**, v. 176, 2017.
14. HAWKES, Peter. The correction of electron lens aberrations. **Ultramicroscopy**, v. 156, 2015.
15. MORISHITA, Shigeyuki et al. Atomic resolution imaging at an ultralow accelerating voltage by a monochromatic transmission electron microscope. *Phys. Rev. Lett.*, v. 117, n. 7, 2016.
16. WILIAMS, David B.; CARTER, C. Barry. **Transmission electron microscopy: a textbook for materials science**. New York: Springer, 1996.
17. EGERTON, Ray F. **Physical principles of electron microscopy: an introduction to TEM, SEM, and AEM**. New York: Springer, 2005.
18. CHEN, Chien-Chun et al. Three-dimensional imaging of dislocations in a nanoparticle at atomic resolution. **Nature**, v. 496, 2013.

19. SMITH, David J. High resolution transmission electron microscopy. In: YAO, Nano; WANG, Zhong L. **Handbook of microscopy for nanotechnology**. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, 2005.
20. WERCKMANN, Jacques; CAMPOS, Andrea P. C.; FARINA, Marcos. Microscopia eletrônica de transmissão de alta resolução. In: SOUZA, Wanderley. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.
21. BENDERSKY, Leonid A.; GAYLE, Frank W. Electron diffraction using transmission electron microscopy. **Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology**, v. 106, n. 6, 2001.
22. MATIAS, Márcia. Desidratação, inclusão, ultramicrotomia e contra-
tação. In: SOUZA, Wanderley. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.
23. NEWBURY, Dale E. et al. High spatial resolution quantitative electron beam microanalysis for nanoscale materials. In: YAO, Nano; WANG, Zhong L. **Handbook of microscopy for nanotechnology**. [S.l.]: Kluwer Academic Publishers, 2005.
24. MIRANDA, Kildare et al. Tomografia eletrônica. In: SOUZA, Wanderley. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.
25. MIRANDA, Kildare et al. Microscopia eletrônica de varredura de duplo feixe. In: SOUZA, Wanderley. **Técnicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia, 2007.

PARTE II

APLICAÇÕES EM SAÚDE

CAPÍTULO 6

Aplicações da Nanotecnologia na prevenção, no diagnóstico e no tratamento do câncer

Marcela G. Landim¹, Alicia S. Ombredane¹, Graziella A. Joanitti^{1,2,*}

1. Introdução

O câncer consiste em dezenas de doenças, que possuem como característica comum serem oriundas de uma ou mais célula(s) com funcionamento anormal, capaz(es) de se replicar(em) incontrolavelmente, muitas vezes formando uma massa tumoral, e com potencial metastático¹. A formação do câncer, a carcinogênese, é geralmente considerada de progressão lenta, e os primeiros sintomas podem levar anos antes de surgirem. Esse processo ocorre a partir de mutações em células saudáveis após exposição prolongada a agentes carcinógenos químicos, físicos e/ou biológicos (por exemplo: tabagismo, alcoolismo, substâncias químicas intercalantes de DNA, estresse oxidativo, asbestos, aflatoxinas, radiação ultravioleta e ionizante, expressão de oncogenes, fatores de crescimento, infecções virais ou bacterianas, envelhecimento celular, entre outros)¹. Se a exposição aos agentes carcinógenos é interrompida, as mutações podem ser revertidas por um mecanismo de ação do próprio organismo. Entretanto, em alguns casos, as mutações persistem, levando ao desenvolvimento progressivo do tumor por múltiplas etapas — iniciação, promoção e progressão¹ (**Figura 1**). Após

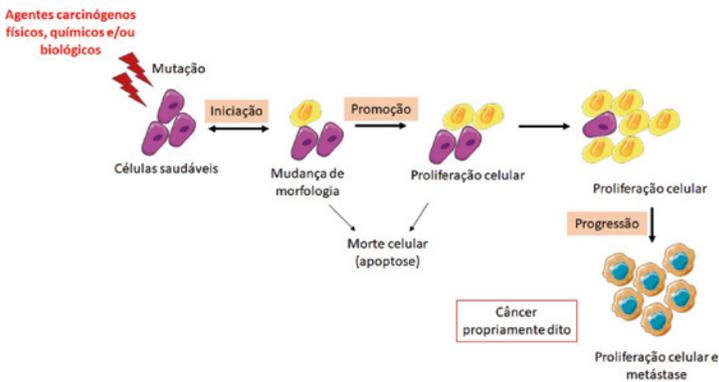
1. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasil

2. Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasil

*E-mail: gjoanitti@unb.br

exposição prolongada a agentes carcinógenos físicos, químicos e/ou biológicos, células saudáveis sofrem mutações e ocorrem mudanças na morfologia celular (iniciação). Nessa fase, as mutações são reversíveis e o mecanismo de morte celular ainda funciona. Se a exposição aos carcinógenos é prolongada, mutações permanecem irreversíveis e são transmitidas às células filhas por replicação do DNA defeituoso (promoção). A proliferação celular continua até iniciar o processo de invasão e metástase para tecidos adjacentes ou distantes da massa tumoral inicial (progressão). O câncer maligno, propriamente dito, é formado.

Figura 1. Esquema ilustrando as fases da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão. Nota: figura criada com imagens de domínio público, obtidas do *Servier Medical Art*



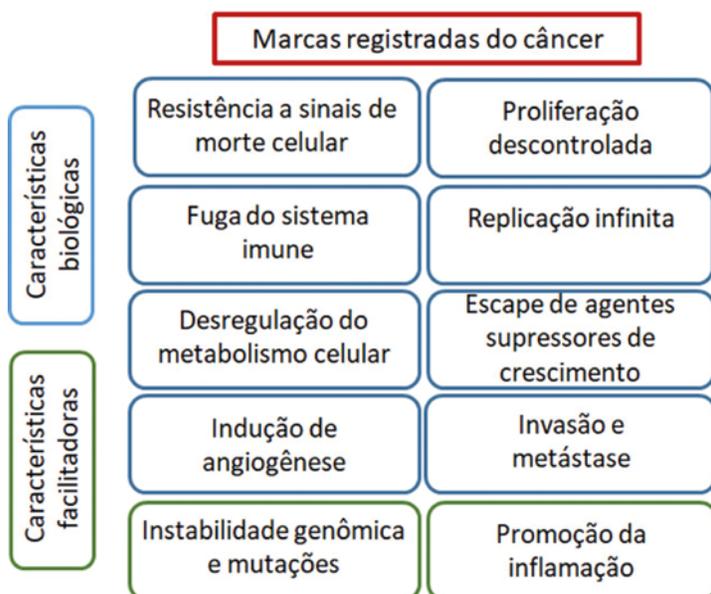
Fonte: elaborada pelos autores.

Além disso, o tecido tumoral precisa adquirir várias características biológicas, conhecidas como “marcas registradas” do câncer (*Hallmarks* — termo empregado em inglês) para se desenvolver, progredir e persistir no organismo. Hanahan e Weinberg (2011) relataram oito características biológicas e duas características “facilitadoras” à progressão do tumor² (**Figura 2**).

Dados da Organização Mundial da Saúde³ apontam que no ano de 2015 as mortes globais, devido à totalidade de cânceres, ultrapassaram

a marca de 8,8 milhões de vítimas, ficando atrás apenas das mortes causadas por doenças cardiovasculares. Os tipos de câncer que mais mataram foram: de pulmão, de fígado, colorretal, de estômago e de mama, em ordem decrescente³.

Figura 2. “Marcas registradas” do câncer. Representação das características biológicas do câncer necessárias para o seu desenvolvimento, progressão e persistência no organismo. As marcas do câncer são classificadas em oito características biológicas complementares (azuis) e duas características facilitadoras à progressão tumoral (verdes)



Fonte: elaborada pelos autores.

Com isso, evidencia-se a importância de se traçarem estratégias de prevenção, diagnóstico e tratamento de neoplasias, considerando que são inestimáveis os danos sociais e econômicos causados por essas patologias. Algumas das estratégias de prevenção são simples de se adotar e amplamente conhecidas: combater o tabagismo e o alcoolismo; manter uma dieta equilibrada e rica em fibras, frutas e vegetais;

praticar atividades físicas regularmente; passar por exames de rotina (mamografia, ecografias, colposcopia, autoexame das mamas); vacinar-se contra doenças infecciosas (principalmente HPV e hepatites); evitar excesso de exposição solar; usar filtro solar, entre outras⁴.

Embora muitos cânceres possam ser prevenidos, alguns são oriundos de oncogenes e mutações herdadas ou adquiridas. Portanto, a detecção precoce da doença é primordial para aumentar as chances de remissão total. Contudo, o diagnóstico é geralmente realizado após o surgimento dos primeiros sintomas, quando o tumor já está em fase mais avançada^{1,2,4}. Dessa forma, cuidar da saúde e realizar exames de rotina são atitudes simples que favorecem a prevenção e/ou detecção precoce de um tumor. Os diagnósticos convencionais consistem de testes citológicos (hemograma) e histopatológicos (biópsia), tomografia computadorizada e imageamento por ressonância magnética; sendo que cada tipo de exame de diagnóstico possui uma determinada sensibilidade e limitação^{2,4}. Paralelamente, os tratamentos convencionais demonstram resultados satisfatórios quando o tumor é detectado em fase precoce. A cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia são amplamente utilizadas no combate aos tumores malignos. Porém, elas são responsáveis por diversos efeitos adversos (morte de células saudáveis, irritação no local da aplicação, recorrência do tumor, alopecia, entre outros), que prejudicam a qualidade de vida dos pacientes^{2,4}. Além disso, células tumorais podem apresentar resistência aos tratamentos supracitados, como já foi observado em diversos tipos de câncer^{5,6}. Diante desse cenário, a busca por novas estratégias de prevenção, diagnóstico e terapia tornou-se uma necessidade.

O uso da nanotecnologia no diagnóstico e/ou no tratamento do câncer evidenciou várias vantagens, devido às propriedades físico-químicas das nanoestruturas. Materiais na escala nanométrica, ou seja, em que pelo menos uma de suas dimensões esteja entre 1 e 100 nanômetros⁷, apresentam propriedades distintas em escala macrométrica: maior razão entre área de superfície/volume, maior reatividade, coloração diferenciada, fluorescência, condutividade elétrica, entre outras. Além

disso, cada nanoestrutura pode apresentar características próprias, devido à sua composição, ao tamanho e ao formato (ver Parte I do livro).

Ao longo deste capítulo, o uso da nanotecnologia na prevenção, no diagnóstico e/ou no tratamento do câncer será abordado. Além disso, as formas de entrega e internalização celular de nanoestruturas serão discutidas, assim como o processo e os desafios da comercialização de medicamentos nanotecnológicos.

2. Formas de entrega de nanoestruturas na região tumoral

A quimioterapia corresponde a um dos tratamentos mais empregados para combater o câncer. Contudo, o uso de quimioterápicos, moléculas administradas no paciente por via parenteral (intravenosa, por exemplo), na maioria das vezes, apresenta várias limitações. De fato, apenas uma pequena proporção do quimioterápico atinge o tumor (sítio alvo) enquanto o restante é distribuído em outros tecidos do organismo. Sendo assim, geralmente uma dosagem maior de quimioterápico é aplicada no paciente, visando aumentar a concentração deste no tumor. Contudo, como tecidos saudáveis também são expostos, esse tipo de tratamento torna-se inespecífico e leva à morte de células saudáveis com o surgimento de diversos efeitos adversos — alopecia (queda de cabelo e de pelos), vômito, fraqueza, entre outros^{8,9}. A nanotecnologia pode contornar essas limitações, permitindo a entrega do quimioterápico na região tumoral com maior especificidade, sem a necessidade de aumentar a concentração deste, minimizando, assim, a exposição de tecidos saudáveis e os efeitos adversos associados a essa terapia.

Portanto, o estudo aprofundado das características tumorais é fundamental para que se determine a melhor forma de administração e entrega de nanoestruturas para uma região tumoral específica. Além

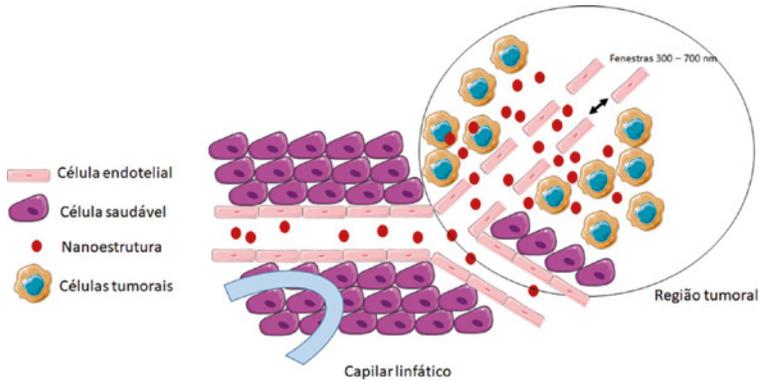
disso, esse entendimento permite a elaboração de nanomateriais mais adequados, com controle de algumas propriedades, tais como o tamanho, a carga, o formato, propriedade de superfície, entre outras. De modo geral, existem dois tipos de entrega de nanomateriais em células tumorais: passiva e ativa.

2.1 Entrega Passiva

Pode-se conceituar como entrega passiva de fármacos aquela que depende apenas de características inerentes à anatomia e à fisiologia do sítio tumoral, não sendo direcionada por meio de afinidades específicas do fármaco com a célula tumoral. Os nanomateriais elaborados para uma entrega passiva são comumente considerados de primeira geração. Alguns medicamentos nanotecnológicos já comercializados são baseados nessa entrega passiva: o Doxil[®]/Caelyx[®] (doxorubicina lipossomal) e o Abraxane[®] (paclitaxel nanoencapsulado)^{10,11}.

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos sanguíneos, que permite a chegada de oxigênio e nutrientes na região tumoral e, assim, possibilita o seu crescimento. Entretanto, no câncer, esse processo ocorre rapidamente e apresenta defeitos, tais como a formação de capilares largos e janelas de 300 nm a 700 nm¹². Além disso, o tumor apresenta baixo retorno venoso e drenagem linfática ineficiente. Todas essas características tumorais são conhecidas como efeito EPR (do inglês *Enhanced Permeability and Retention*, que significa “permeabilidade e retenção aumentada”), ilustrado na **Figura 3**. Esse efeito consiste no acúmulo preferencial de nanoestruturas na região tumoral por meio das janelas dos vasos, e permanecem no local por um longo período, permitindo, assim, maior eficiência. Contudo, apesar de o efeito EPR minimizar efeitos adversos associados ao tratamento, ele não impede o acúmulo de nanoestruturas em outros órgãos que apresentam janelas endoteliais, tais como o fígado e baço¹⁰. Além disso, a heterogeneidade do tumor pode dificultar uma biodistribuição homogênea das nanoestruturas para toda a região tumoral, o que reduz a especificidade desse tipo de entrega.

Figura 3. Efeito de Retenção e Permeabilidade Aumentada (EPR) como estratégia de entrega passiva de nanofármacos. A presença de fenestras de 300 nm a 700 nm permite o acúmulo preferencial de nanoestruturas no tecido tumoral. Além disso, o baixo retorno venoso e a drenagem linfática ineficiente contribuem para a entrega passiva de nanoestruturas na região tumoral. Nota: figura criada com imagens de domínio público obtidas do *Servier Medical Art*



Fonte: elaborada pelos autores.

Outro fator intrínseco do sítio tumoral e que também facilita a liberação de fármacos nanoencapsulados é o seu microambiente ácido. Devido ao elevado metabolismo das células neoplásicas, estas passam a realizar respiração anaeróbia, produzindo ácido láctico e ácido carbônico. Além disso, um acúmulo de íons H^+ é promovido pela baixa drenagem linfática¹³. Essa diminuição do pH colabora para a desestabilização de nanoestruturas, como micelas poliméricas e de polimerossomos, promovendo a liberação dos seus conteúdos no local do câncer, como descrito no trabalho de Huang e colaboradores (2015). Eles elaboraram micelas compostas por triblocos poliméricos (PEG-PAU-PEG) carregando o quimioterápico doxorrubicina (DOX), que liberaram até 96% do fármaco encapsulado dentro de 48 horas de exposição a um ambiente ácido (pH 4)¹⁴. De modo similar, Hu e sua equipe (2013) criaram uma nanopartícula com núcleo de hidrogel e DOX, e casca de sílica mesoporosa, com atividade anticâncer de mama (MCF-7), que também foi responsiva ao pH ácido, liberando a DOX contida no núcleo¹⁵.

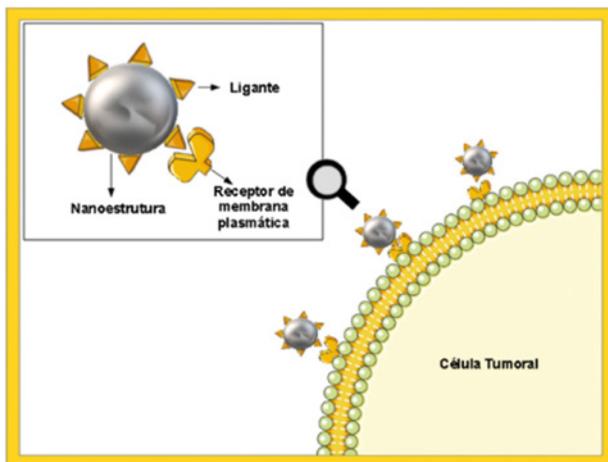
Embora suas características sugiram uma forma de entrega eficiente, o efeito EPR é bastante limitado. Segundo Wilhelm e colaboradores (2016), menos de 1% dos sistemas nanoestruturados chegam aos tumores que possuem alto efeito EPR¹⁶. Entretanto, de modo geral, a nanoencapsulação de fármacos aumenta a eficiência de entrega e a retenção no sítio tumoral, se comparada com a administração do fármaco livre¹¹.

Dessa forma, nanoestruturas ditas de segunda geração representam alternativa à entrega passiva¹⁰. Essa classe de nanoestruturas possui superfícies funcionalizadas por moléculas específicas, que aumentam a especificidade e a eficiência da entrega do fármaco de interesse, como será visto a seguir.

2.2 Entrega ativa

A entrega ativa consiste em uma entrega direcionada de nanoestruturas por meio da funcionalização de suas superfícies com ligantes (anticorpos, ácido fólico, carboidratos, peptídeos, proteínas, oligonucleotídeos, entre outros) de receptores presentes na célula tumoral, como ilustrado na **Figura 4**. Essa estratégia baseia-se nas relações de afinidade, geradas por atração química e/ou eletrostática (interações entre cargas, forças de van der Waals, afinidade química, polaridade...) entre moléculas complementares, como anticorpo-antígeno, receptores-ligantes e enzima-substrato^{10,17}.

Figura 4. Entrega ativa de nanoestruturas, mediada por ligantes que reconhecem, especificamente, receptores de membrana da célula tumoral. Nota: figura criada com imagens de domínio público obtidas do *Servier Medical Art*



Fonte: elaborada pelos autores.

Para que a entrega de nanoestruturas por via ativa seja eficiente, é importante que elas possuam baixa afinidade por células saudáveis e que permaneçam estáveis por tempo suficiente para evitar degradação precoce, interação com proteínas não específicas presentes na corrente sanguínea e o processo de opsonização¹⁰. A superfície de alguns tipos de células tumorais apresenta moléculas específicas, denominadas biomarcadores, que facilitam a sua detecção. Assim, considerando a presença e a natureza desses biomarcadores, a funcionalização específica de nanoestruturas permite aumentar a sua afinidade e a interação com o tecido tumoral, e, conseqüentemente, melhorar a sua eficiência. Alguns exemplos de biomarcadores tumorais são mencionados a seguir.

Os receptores de folato são biomarcadores intensamente expressos em diversos cânceres, como de ovário, mama, cervical, fígado, pulmão, colorretal e cérebro. Eles estão presentes, também, em tecidos sau-

dáveis (placenta, pulmão, fígado e plexo coroide), porém, em menor quantidade e apenas na parte apical das células, diminuindo os riscos de interação com células saudáveis¹⁷. Nanocápsulas poliméricas de poli-lactato-co-glicolato (PLGA), contendo um núcleo de quercetina e conjugadas a polietilenoglicol (PEG) e moléculas de folato, apresentaram efeito citotóxico com cerca de 40% de redução da viabilidade celular, *in vitro*, em células HeLa (câncer cervical humano). Além disso, houve maior captação *in vivo* em HeLa e em IGROV-1 (células de câncer ovariano humano), quando comparado com a quercetina livre e nanocápsulas sem PEG e/ou sem folato¹⁸.

Outro biomarcador encontrado em maior quantidade em tecidos tumorais, como colorretal, cérebro, mama, ovário, pâncreas e próstata, são os receptores de fator de crescimento epidérmico (EGFR). Esses receptores são conhecidos por estimular o crescimento tumoral e o processo de metástase^{19,20}. Nanoesferas de ouro revestidas por aptâmeros (pequenas moléculas de RNA/DNA) e anticorpo demonstraram maior afinidade por receptores de fator de crescimento epidérmico, presentes em células tumorais de cabeça e pescoço, quando comparado com nanoesferas sem revestimento, *in vitro* e *in vivo*²¹.

Receptores de transferrina são considerados biomarcadores de algumas células de câncer de cólon, por apresentarem intensa expressão na superfície destas. Nanocápsulas de H-ferritina contendo doxorubicina (HF_n-DOX, 12 nm de diâmetro) foram formuladas por Liang e colaboradores (2014) para avaliar a inibição da viabilidade celular de células de câncer de cólon (HT-29). A nanoencapsulação de elevadas concentrações de doxorubicina dentro da casca de ferritina aumentou em mais de 10 vezes a captação de HF_n-DOX pelas células HT-29 *in vitro* e resultou em um efeito inibitório significativo sobre a massa tumoral *in vivo*, quando comparado aos camundongos BALB/c tratados com PBS, doxorubicina livre, doxorubicina lipossomal (Doxil) ou nanocápsulas de HF_n vazias²².

Receptores transmembrana do tipo integrina possuem papel fundamental na adesão e migração celular, assim como na regulação do citoesqueleto. Em células tumorais de carcinoma de células escamosas da cavidade oral (HSC-3), esses receptores apresentam papel na regulação do processo de metástase. Portanto, nanopartículas de ouro acopladas ao peptídeo RGD (arginina-glicina-ácido aspártico), que possui expressiva afinidade por receptores de integrina, foram capazes de inibir a migração celular e, conseqüentemente, controlar a metástase *in vitro*²³. Além disso, receptores do tipo integrina podem ser alvo de nanomateriais elaborados para diagnóstico de câncer. Pontos quânticos de sulfeto de prata, acoplados ao peptídeo arginina-glicina-ácido aspártico-(D)-fenilalanina-lisina (molécula com afinidade para receptor integrina), demonstraram maior acúmulo na região tumoral (câncer de mama) após administração pela veia da cauda, *in vivo*, permitindo a sua detecção por técnicas de imagens²⁴.

Esses estudos são apenas uma pequena amostra dos exemplos de nanomateriais funcionalizados, que realizam entrega ativa de moléculas para o diagnóstico e/ou tratamento de carcinomas, tanto *in vitro* como *in vivo*, e demonstram possibilidades de terapias inovadoras e promissoras.

2.2 Internalização e destino intracelular

A entrega de nanoestruturas na região tumoral, como visto anteriormente, é apenas a parte preliminar do seu caminho no organismo. Elas podem interagir com componentes da membrana plasmática e serem internalizadas pela célula. Contudo, a internalização não é sempre necessária. De fato, uma nanoestrutura presente no microambiente tumoral pode liberar o seu conteúdo, constituído por moléculas pequenas, tais como doxorrubicina, que podem atravessar a membrana plasmática por difusão simples¹⁰. Entretanto, a internalização permanece de maior interesse e pode ocorrer de forma passiva (simples difusão, microinjeção ou eletroporação) ou de forma ativa por meio de mecanismos de endocitose²⁵.

É fundamental lembrar que as características físico-químicas de nanomateriais (tamanho, formato e propriedades de superfície) interferem no processo de internalização. Vários estudos investigaram a influência do tamanho da nanoestrutura na internalização. Foi relatado que uma mesma nanopartícula é mais bem internalizada quando possui tamanho maior. Por exemplo, uma nanoestrutura é mais bem internalizada quando apresenta tamanho de 17 nm em vez de 4 nm. Igualmente, a nanopartícula de 98 nm é mais bem internalizada por células de carcinoma cervical (HeLa) e de pele melanoma (A549) em comparação com a nanopartícula de 26 nm. Além disso, nanoestruturas com carga positiva apresentam maior internalização de que nanopartículas negativas²⁵. Portanto, controlando essas características, é possível direcionar o mecanismo de internalização e a sublocalização celular²⁶. Adicionalmente, Behzadi e colaboradores (2017) descrevem que uma nanoestrutura pode ser internalizada por meio de mecanismos distintos, de acordo com o tipo celular²⁵. Dessa forma, as características celulares e biológicas também devem ser consideradas antes da aplicação de nanoestrutura. A via de internalização, bem como o destino das nanoestruturas podem influenciar diretamente na ativação/funcionamento do composto bioativo/fármaco carregado e, consequentemente, em sua eficiência. Portanto, a compreensão dessas características contribui para a elaboração de um desenho racional de nanoestruturas ideais para aplicação na área de câncer^{25,26}.

Para melhor entendimento, diversos mecanismos de internalização e diferentes organelas de acúmulo de nanoestruturas são discutidos a seguir.

2.2.1 Mecanismos de internalização

As principais vias de internalização ocorrem por endocitose, classificadas em dois tipos, de acordo com o tipo celular e a natureza das moléculas envolvidas no processo: a fagocitose e a pinocitose (**Figura 5**)^{19,25}.

O processo de fagocitose ocorre normalmente em diversos tipos celulares, tais como macrófagos, monócitos, neutrófilos, células dendríticas, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, entre outras, e apresenta como principal objetivo a remoção de partículas estranhas, microrganismos infecciosos e células em senescência. Nanopartículas presentes no organismo podem ser fagocitadas por meio do reconhecimento de ligantes na sua superfície por receptores celulares superexpressos em tumores. A internalização de nanopartículas pode ocorrer, também, a partir da opsonização. Esse fenômeno consiste na adsorção de proteínas da corrente sanguínea na superfície dos nanomateriais. Em seguida, há interação dessas proteínas com receptores celulares, gerando a formação de vesículas (fagossomos) contendo os nanomateriais, que são levadas para dentro da célula. A fagocitose pode levar várias horas para acontecer e o mecanismo depende da natureza do nanomaterial e do tipo celular^{19, 25}.

A pinocitose é o processo de internalização mais comum, e é dividido em quatro subcategorias, de acordo com a molécula mediadora. A via de pinocitose mais estudada é denominada endocitose mediada por receptores de clatrina. Na maioria dos casos, nanoestruturas superiores a 200 nm são internalizadas por meio dessa via²⁷. Ela ocorre em região da membrana plasmática rica em clatrina, que representa em torno de 1% da superfície celular. Para a formação de vesículas que possuem de 100 nm a 150 nm, a membrana plasmática vai sofrer uma curvatura com auxílio de uma extensa maquinaria de proteínas (epsina, SNX9, anfifisina, entre outras). Uma desvantagem dessa via é que, geralmente, o conteúdo das vesículas é levado até os lisossomos, onde sofre degradação^{19, 25}. Portanto, essa via pode ser ineficiente para alguns tipos de nanoestruturas e é importante levar em consideração as propriedades dos nanomateriais, antes da aplicação. Nanopartículas magnéticas, acopladas com PEG e ácido fólico, demonstraram internalização em células de câncer cervical HeLa, via endocitose dependente de clatrina, com acúmulo maior em lisossomos. Em contrapartida, elas não foram internalizadas em células de câncer de mama MCF-7 e MDA-MB435. Porém, a atividade anticâncer não foi avaliada nesse caso²⁸.

Em outro estudo, a conjugação do peptídeo interleucina 13 (IL-13) às nanopartículas aumentou a internalização em células de glioma, por via de endocitose dependente de clatrina *in vitro* e *in vivo*. Além disso, a aplicação dessas nanoestruturas contendo doxorrubicina aumentou a taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c²⁹.

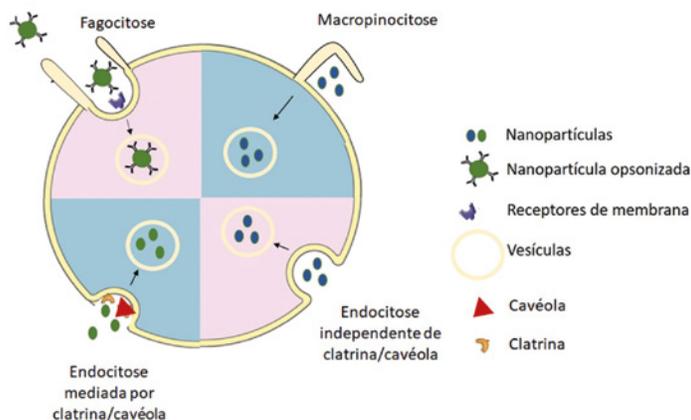
A pinocitose mediada por cavéolas apresenta papel fundamental em diversas atividades biológicas, tais como regulação de lipídios, ácidos graxos e sinalização celular. As cavéolas correspondem a uma curvatura da membrana plasmática, com a presença de várias proteínas, como a caveolina e a cavina. Essas proteínas ajudam na formação de vesículas (caveossomos), que apresentam em torno de 50 nm - 80 nm^{19,25,27}. Moléculas internalizadas por cavéolas podem escapar da degradação nos lisossomos, devido ao pH neutro dos caveossomos. Portanto, o conteúdo das vesículas é dirigido para outros compartimentos subcelulares, geralmente para o complexo de Golgi ou o retículo endoplasmático¹⁹.

A internalização pode ocorrer também por pinocitose, independente de clatrina e cavéola. Nesse caso, as células apresentam composição lipídica específica, principalmente colesterol^{19,25}. O ácido fólico é um exemplo de molécula que é internalizado por essa via. Portanto, nanoestruturas acopladas com ácido fólico possuem grande probabilidade de serem internalizadas por pinocitose, independente de receptor²⁵. Nanoestruturas lipossomais contendo o quimioterápico doxorrubicina foram internalizadas por via independente de clatrina e cavéola em células de carcinoma epitelial A375 e em células de hepatoma HepG2 *in vitro*³⁰.

Recentemente, a macropinocitose foi considerada como mais um mecanismo não específico de internalização de moléculas sem envolver proteínas ou lipídios. Esse processo consiste em rearranjo do citoesqueleto, permitindo formação de vesículas de 0,2 a 10 micrômetros por extensão da membrana plasmática (pseudópodos)^{19,26}. Microrganismos, tais como vírus e bactérias, são internalizados, principal-

mente via macropinocitose. Devido ao tamanho maior das vesículas (macropinosomo), nanoestruturas maiores podem ser internalizadas preferencialmente por essa via. Nanopartículas contendo doxorubicina foram internalizadas por células de glioma, via macropinocitose. A funcionalização da superfície dessas nanopartículas com peptídeo interleucina 13 levou a uma mudança de via de internalização²⁹.

Figura 5. Esquema ilustrando os diferentes mecanismos de internalização de nanoestruturas por endocitose: fagocitose; endocitose mediada por clatrina ou cavéola; endocitose independente de clatrina e cavéola; e macropinocitose. Nota: figura criada com imagens de domínio público obtidas do *Servier Medical Art*



Fonte: elaborada pelos autores.

2.2.2 Destino intracelular

Um fato interessante de se citar é que, além da seletividade por células tumorais, os nanomateriais elaborados recentemente podem apresentar especificidade por um compartimento subcelular. De fato, o acúmulo de nanoestruturas em um determinado compartimento intracelular está associado a um efeito anticâncer específico. Em outras palavras, o mecanismo de ação de uma determinada molécula depende da organela na qual ela é acumulada. Geralmente, o complexo de Golgi, o núcleo, o retículo endoplasmático, a mitocôndria e o lisossomo são os compartimentos intracelulares de maior acúmulo por nanomateriais^{25,26} (**Tabela 1**).

Tabela 1. Exemplos de nanoestruturas, mecanismo de internalização e destino intracelular em diversos tipos de câncer

Tipo de nanomaterial	Tipo de câncer	Tipo de internalização	Destino intracelular	Referência
Nanopartículas magnéticas com PEG e ácido fólico	Carcinoma cervical (HeLa)	Endocitose mediada clatrina	Lisossomo	[28]
Nanopartículas contendo doxorubicina	Glioblastoma (U87)	Macropinocitose	Macropinosomo	[29]
Nanopartículas acopladas a interleucina 13 contendo doxorubicina	Glioblastoma (U87)	Endocitose mediada por clatrina/fagocitose	Endossomo, fagossomo	[29]
Lipossoma contendo doxorubicina	Melanoma (A375) e hepatoma (HepG2)	Endocitose independente de receptor	Endossomo, lisossomo	[30]
Nanopartículas magnéticas com PEG FITC	Glioblastoma (U87)	-	Lisossomo	[31]
Nanopartículas de Timoquinona	Câncer de mama MCF-7 and MDA-MB-231	Endocitose mediada por caveolina e clatrina	Citoplasma e núcleo Endossomo e lisossomo	[32]

Fonte: elaborada pelos autores.

2.3 Aplicações da nanotecnologia na oncologia

2.3.1 Nanotecnologia e prevenção do câncer

De acordo com a Organização Mundial da Saúde³, metade dos cânceres podem ser prevenidos. A maioria das pessoas já ouviu falar de, pelo menos, uma das principais recomendações para prevenir o câncer, que incluem não fumar, manter alimentação saudável e peso corporal adequado, praticar atividade física, amamentar e realizar exames preventivos ginecológicos para mulheres, evitar bebida alcoólica e exposição ao sol entre as 10 horas e as 16 horas, vacinar contra o HPV, entre outros⁴. Provavelmente, a alimentação saudável é a recomendação mais explorada por cientistas e médicos. De fato, inúmeros livros sobre a dieta “anticâncer” podem ser encontrados nas livrarias. Apesar disso, 12,7 milhões de novos casos de câncer são ainda diagnosticados no mundo, por ano, o que leva pesquisadores a elaborarem novas estratégias para a prevenção dessa patologia³.

O conceito de quimioprevenção foi introduzido por Sporn e colaboradores, em 1976, e consiste no uso de moléculas capazes de reduzir o risco de desenvolvimento e/ou progressão do câncer³². Essas moléculas foram denominadas de “nutracêuticos” por Stephen L. Defelice, em 1989, combinação dos termos “nutrientes” e “farmacêuticos”, que representam qualquer substância encontrada em um alimento que apresenta benefício à saúde, incluindo prevenção de doenças³². Classificados em agentes bloqueadores e supressores, os nutracêuticos agem no início da carcinogênese, prevenindo mutações do DNA, inibindo a proliferação e a diferenciação celular e ativando vias de morte celular^{33,34,35}. Dentre as moléculas empregadas na quimioprevenção, tais como vitaminas, ácidos graxos, fenóis, carotenoides, probióticos e prebióticos, entre outros, cerca de 40% apresentam baixa dispersão em meio aquoso e, portanto, biodistribuição e biodisponibilidade reduzidas no organismo. Dessa forma, o uso da nanotecnologia levou ao surgimento do conceito de “nanoquímio-prevenção”, que corresponde, basicamente, no uso de nanopartículas como carreadores de compostos bioativos para prevenir o desenvolvimento do câncer³⁴.

O efeito preventivo do epigallocatequina-3-galato, polifenol do chá-verde, encapsulado em nanopartículas poliméricas à base de PLA-PEG e PLGA-PEG, foi avaliado em células normais e cancerosas de próstata. A atividade preventiva foi observada *in vitro* e *in vivo* com efeitos pró-apoptótico, antiproliferativo e inibidor da angiogênese^{36,37}. De acordo com Sibbiqui e colaboradores (2015, 2016), o encapsulamento do resveratrol (polifenol não flavonoide) e da curcumina (polifenol) em nanoestruturas é bastante estudado na prevenção de diversos tipos de câncer, como ovário, próstata, glioma, cabeça e pescoço e cólon^{33,34} **(Tabela 2)**. Apesar dos resultados promissores, poucos estudos investigam o uso da nanotecnologia na prevenção do câncer, privilegiando buscas para diagnóstico e tratamento, como é visto a seguir.

Tabela 2. Exemplos de nanoestruturas aplicadas para prevenção de câncer

Tipo de nanomaterial	Tipo de câncer	Molécula carregada	Mecanismo de ação	Referência
Nanopartículas poliméricas à base de PLA-PEG	Próstata	Epigallocatequina-3-galato (EGCG) (polifenol do chá-verde)	Antiproliferativo	[36]
Nanopartículas poliméricas à base de PLGA-PEG	Próstata	Epigallocatequina-3-galato	Pró-apoptótico e inibição da angiogênese	[37]
Lipossomo	Próstata	Resveratrol/ curcumina	Antiproliferativo	[33,34]
Nanopartícula de quitosana	Melanoma	Resveratrol/ curcumina/5-fluorouracil	Indução de apoptose	[33,34]

Fonte: elaborada pelos autores.

2.3.2 Nanotecnologia aplicada ao diagnóstico de câncer

O diagnóstico precoce do câncer é fundamental para obter maiores chances de remissão tumoral. Várias técnicas podem ser usadas, tais como testes citológicos (hemograma) e histopatológicos (biópsia), ultrassonografia, tomografia computadorizada e imageamento por ressonância magnética. Contudo, esses testes apresentam limitações de detecção e, muitas vezes, detectam o tumor já em fase de desenvolvimento avançada^{38,39}. Portanto, testes mais sensíveis e específicos precisam ser elaborados. Os nanomateriais também podem ser utilizados como marcadores/sensores em exames diagnósticos, possibilitando uma maior sensibilidade de detecção da região tumoral. Essa vantagem é particularmente importante no diagnóstico de tumores em estágios iniciais, possibilitando, conseqüentemente, um tratamento mais precoce e eficaz.

Um exemplo real de nanossensor para a detecção de múltiplos cânceres foi prototipado por Peng e colaboradores (2010). É constituído de nanopartículas de ouro, arranjadas de forma circular sobre 10 pares de eletrodos de ouro dispostos de forma concêntrica, funcionaliza-

das com moléculas orgânicas capazes de se associarem a compostos voláteis originários da oxidação de substâncias da membrana de células tumorais, que estão presentes no hálito de pacientes portadores dos cânceres de pulmão, mamas, próstata e colorretal⁴⁰. Quando os pacientes portadores de câncer sopram no sensor, a ligação dos compostos voláteis às nanopartículas funcionalizadas altera a resistência do material, permitindo a captação desse sinal pelos eletrodos. Como cada câncer gerou um padrão diferente de variação de resistência elétrica, foi possível distinguir qual o tipo de câncer que o paciente possuía, além de determinar se havia a presença ou não de câncer. Além disso, vale ressaltar que essa foi uma estratégia não invasiva de detecção de neoplasias.

Outra aplicação interessante da nanotecnologia em sensores foi abordada no trabalho de Zhang e colaboradores (2005), que desenvolveu pontos quânticos funcionalizados com fitas simples de “DNA capturador” capazes de se ligar a um DNA-alvo, que, por sua vez, foi capaz de ligar-se a um DNA associado a uma fluoresceína (Cy5). Essas nanopartículas foram utilizadas para a detecção de uma sequência específica de DNA, contendo uma mutação pontual associada ao tumor de ovário, possuindo como diferencial uma maior capacidade de captura do DNA-alvo, além de possibilitar a amplificação da fluorescência de Cy5 por transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET), facilitando o imageamento desse nanossistema *in vitro*⁴¹.

Uma estratégia de entrega de plataformas nanoestruturadas reside nas células-tronco mesenquimais humanas (hMSCs), que funcionam como um “Cavalo de Troia”, já que estas podem carregar as nanopartículas em seu interior e direcioná-las ao sítio tumoral, devido à capacidade dessas células em serem espontaneamente atraídas para esse local. Conhecendo essa propriedade das hMSCs, Kim e colaboradores (2014) desenvolveram um agente de contraste baseado em nanopartículas de gadolínio, carregadas por células mesenquimais, para o diagnóstico *in vivo* de tumor de cólon por ressonância magnética⁴².

Tais estratégias tecnológicas apresentadas anteriormente, além de muitas outras, como as citadas na **Tabela 3**, demonstram que os nanomateriais, por estarem em uma escala de tamanho pequena (de 10^{-9} m), conseguem interagir com moléculas biológicas, a fim de gerar sinais amplificados que se podem captar, interpretar e auxiliar na tomada de decisões cruciais, com a finalidade de se tratar um câncer.

Tabela 3. Exemplos de nanomateriais utilizados no diagnóstico do câncer

Nanomaterial	Tipo de Câncer	Método Empregado	Sucesso	Referência
Nanopartículas de ouro	Pulmão, mamas, próstata e colorretal	Nanossensor de moléculas voláteis do hálito de pacientes	Deteção e distinção entre os cânceres de forma não invasiva	[40]
Nanocristal (QD) de CdSe-ZnS (core-shell)	Alguns tumores de ovário	Nanossensor de oligonucleotídeos específicos. Baseia-se na transferência de energia por ressonância de fluorescência (FRET)	Deteção de mutações pontuais presentes em oligonucleotídeos de alguns tumores de ovário	[41]
Óxido de grafeno e nanopartículas de poli-L-lactato (PLLA)	Próstata	Nanossensor para deteção de PSA e VEGF. Consiste em uma folha de grafeno que reveste os eletrodos recoberta por oligonucleotídeos ligantes de VEGF. Este, por sua vez, conjuga-se a nanopartículas de PLLA funcionalizadas com anti-VEGF e anti-PSA	Detecta, em menos de 1 hora, duas moléculas, concomitantemente, presentes no plasma de pacientes portadores do câncer de próstata, em concentrações acima de 50 pg/mL (VEGF) e 1 ng/mL (PSA), evitando diagnósticos falso-positivos	[43]
Nanopartículas de pululano e gadolínio internalizadas por células mesenquimais	Cólon (enxerto)	Agente de contraste nanoestruturado carregado por células mesenquimais até o sítio tumoral, otimizando a localização e a visualização do tumor por ressonância magnética	As células mesenquimais carregadas com as nanopartículas de gadolínio permitiram detectar o tumor no estágio inicial em apenas 2 horas após a sua administração endovenosa em camundongos	[42]

Filmes nanométricos de ouro	Leucemia	Chip de plástico com uma camada de ouro nanométrica, possuindo buracos nanométricos, revestida com proteína A como âncora de anticorpos específicos do antígeno lambda, superexpressos em pacientes portadores de leucemia. A detecção do anticorpo se dá por meio de ressonância plasmônica de superfície	Consegue detectar com sucesso um desequilíbrio na proporção de anticorpos, presente em amostras de sangue de pacientes com leucemia	[44]
-----------------------------	----------	--	---	------

Siglas: QD = pontos quânticos; PSA = antígeno prostático específico; VEGF = fator de crescimento endotelial vascular.

Fonte: elaborada pelos autores.

2.3.3 Uso de nanoestruturas no tratamento do câncer

Os tratamentos mais empregados para o câncer, atualmente, são a cirurgia, a quimioterapia e a radioterapia. Apesar de apresentarem eficácia, especialmente em casos diagnosticados precocemente, esses métodos apresentam também efeitos adversos, como fraqueza, vômitos, queda de cabelo, cansaço, diarreias, feridas na boca, queimaduras e ressecamento da pele^{45,46}; comprometendo a qualidade de vida dos pacientes. Portanto, a nanotecnologia pode ser empregada de diversas formas para contornar os efeitos adversos de tratamentos convencionais, trazendo várias vantagens.

2.3.3.1 Entrega de compostos bioativos (“Drug Delivery”)

Alguns dos principais problemas dos quimioterápicos convencionais são a toxicidade sistêmica, baixa especificidade celular e baixa dispersão no plasma sanguíneo. Tudo isso acarreta menor eficácia de tratamento, por limitar a dose máxima administrada, por induzir o surgimento de efeitos adversos e resultar em uma baixa biodisponibilidade do fármaco no organismo, diminuindo a eficiência de entrega ao tumor⁴⁷. Buscando superar tais desvantagens, muitos estudos citados a seguir demonstram empiricamente que fármacos convencionais, quando associados a nanoestruturas, têm sua dispersão em meio biológico melhorada, apresentam menor toxicidade, maior biodisponibilidade,

menos efeitos adversos e mantêm-se dentro da janela terapêutica por meio da sua liberação sustentada no sítio tumoral⁴⁷.

Dentre os principais nanomateriais utilizados como sistemas de entrega de fármacos, podem-se citar as nanopartículas poliméricas, as nanoemulsões (micelas), as nanopartículas lipídicas sólidas, os dendrímeros, os lipossomos, os nanotubos de carbono e as nanopartículas metálicas.⁴⁷

Em uma abordagem relativamente inovadora de exploração de novos fármacos naturais associados à nanobiotecnologia, Zhou e colaboradores (2013) elaboraram uma micela polimérica formada por blocos copoliméricos de quitosana-policaprolactano galactosilados (Gal-CH-PCLs) contendo curcumina, que é um polifenol de extratos vegetais insolúvel em água, com interessantes propriedades antitumorais.⁴⁸ Nesse trabalho, eles demonstraram um aumento de 2 a 4 vezes da captação da curcumina nanoencapsulada, em comparação com a curcumina livre, por células de câncer cervical (HeLa) e por células de hepatocarcinoma (HepG2) *in vitro*, e, conseqüentemente, uma indução da morte celular por apoptose e necrose 6 vezes maior, quando comparada com o tratamento com curcumina livre, após 72 horas de incubação. Isso corrobora com o paradigma de que a nanoestruturação favorece o aumento da eficiência de captação de compostos bioativos e melhora a biodisponibilidade de compostos hidrofóbicos.

Outra forma de entrega de fármacos, a nanoemulsão, foi estudada por Tagne e colaboradores (2008), que nanoemulsificaram o quimioterápico tamoxifen (causa danos ao DNA) associado a óleo de soja, formando micelas de diâmetro hidrodinâmico médio de 46 nm, e testaram seu efeito anticâncer em células de câncer de mama (HTB-20), *in vitro*.⁴⁹ O tamoxifen nanoemulsionado demonstrou uma diminuição da proliferação celular em 97%, contra 66% do tamoxifen livre. Além disso, essa nanoemulsão promoveu a apoptose em 40% das células tratadas em HTB-20, quatro vezes mais quando comparada ao fármaco livre.

Por sua vez, Zhang e colaboradores (2014) formularam dendrímeros peptídicos (glicina-fenilalanina-leucina-glicina, medindo cerca de 100 nm de diâmetro) contendo doxorrubicina (DOX), para a entrega nanoestruturada desse fármaco. Os ramos tetrapeptídicos são clivados pela enzima lisossomal catepsina B, abundante em células tumorais, liberando a DOX no meio intracelular de células de tumor mamário murino 4T1.⁵⁰ Os dendrímeros na dose de 4 mg/kg de doxorrubicina foram mais eficazes na inibição tumoral (~ 60%) *in vivo* do que a DOX livre na mesma concentração (~ 45%). Além disso, a DOX dendrímica nas concentrações testadas não apresentou citotoxicidade ao coração, fígado, baço, pulmão e rim, ao contrário do fármaco livre, corroborando com a teoria de que a nanoestruturação de quimioterápicos diminui a toxicidade aos tecidos e órgãos não alvo.

Um estudo que desperta a curiosidade foi o trabalho de Wang e colaboradores (2011) que avaliou os efeitos antitumorais, *in vitro* e *in vivo*, de lipossomos contendo resveratrol (~ 70 nm), funcionalizados com dequalinium polietilenoglicol-diestearoil-fosfatidiletanolamina (DQA-PEG200-DSPE) para o direcionamento mitocondrial, em células de carcinoma pulmonar não resistentes (A549) e resistentes (A549/cDDP).⁵¹ Os pesquisadores compararam a atividade anticâncer entre os lipossomos funcionalizados e os não funcionalizados, em combinação com lipossomos contendo vinorelbina (um alcaloide semissintético utilizado como quimioterápico). Os resultados indicaram uma expressiva atividade antitumoral *in vitro* dos lipossomos contendo resveratrol contra A549 (inibição > 80%) e A549/cDDP (inibição de cerca de 60%), após 96 horas de tratamento. Foi demonstrado que lipossomos contendo vinorelbina, combinados a lipossomos funcionalizados contendo resveratrol, foram eficazes no combate às células resistentes, o que não ocorreu no tratamento contendo apenas lipossomos de vinorelbina. O tratamento solo e combinado com lipossomos de resveratrol funcionalizados ocasionou uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, que, por sua vez, engatilhou a liberação de citocromo c, a ativação de caspases e culminou em apoptose nas células tratadas (A549 e A549/cDDP). E, por fim, no tratamento *in vivo*, ao longo de 27

dias, em camundongos nude, os lipossomos de resveratrol funcionalizados levaram a uma melhor distribuição do fármaco pelas camadas celulares tumorais e a uma diminuição da massa tumoral de 85,81%, contra 49,87% de remissão no tratamento com resveratrol livre.

Todos esses resultados apontam na mesma direção, fortalecendo a premissa de que a nanoencapsulação de compostos bioativos potencializa seus efeitos antitumorais. Dentre muitos outros, estes são apenas alguns exemplos de nanossistemas utilizados como carreadores de moléculas terapêuticas, visando a um tratamento mais eficaz contra o câncer e que reduza efeitos adversos provocados por quimioterápicos convencionais.

2.3.3.1.2. Componentes estruturais de nanoemulsões como componentes bioativos

Algumas nanoestruturas, como as nanoemulsões, podem apresentar constituintes estruturais (fase oleosa, por exemplo), que possuem atividade antitumoral. Pode-se citar o exemplo de um trabalho desenvolvido no Laboratório de Compostos Bioativos e Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília, onde Sampaio (2017) formulou uma nanoemulsão à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa* Mart.) que apresentou atividade antitumoral *in vitro* contra células de câncer de mama MCF-7, reduzindo a viabilidade de cerca de 50% das células quando tratadas com a concentração de óleo nanoemulsionado de 360 µg/mL por 24 horas.⁵² Assim, o óleo de buriti, por possuir em sua constituição ácidos graxos e outras moléculas com potencial terapêutico, atuou nessa nanoemulsão tanto como constituinte estrutural como componente bioativo.

Outro exemplo são as nanopartículas de prata (AgNPs), sintetizadas por Ombredane (2016), utilizando extrato de *Curcuma longa* L. para a redução do nitrato de prata⁵³. Além disso, o polissacarídeo quitosana foi adicionado à formulação, com o intuito de revestir as nanopartículas, aumentando a estabilidade, a biocompatibilidade e a biodegradabilidade das AgNPs. Essas nanopartículas foram testadas em células

de câncer de pele não melanoma (A431), e apresentaram citotoxicidade em cerca de 50% dessas células, com a concentração de 50 μM após 24 horas de tratamento. Além disso, o revestimento das AgNPs por quitosana induziu a parada celular de A431 na fase G1 da divisão celular. Assim, a prata, que inicialmente exercia a função de componente estrutural, tornou-se também um componente bioativo dessa nanoestrutura.

2.3.3.2. Terapia fotodinâmica

A terapia fotodinâmica é uma estratégia promissora para a destruição de células tumorais, que se baseia na administração de moléculas fotossensibilizantes no paciente. Após exposição à luz em comprimento de onda específico e na presença de oxigênio, tais moléculas são ativadas e se tornam tóxicas, levando à morte celular por estresse oxidativo^{54,55}.

Pan et al. (2015) demonstraram que a associação do fotossensibilizante ftalocianina a nanoesferas de dióxido de titânio dopados com nitrogênio (N-TiO₂) (diâmetro entre 25 nm e 40 nm) aumentou a sua captação celular em carcinoma cervical humano (HeLa) e carcinoma nasofaríngeo humano (KB)⁵⁶. Além disso, a conjugação de ftalocianina a nanopartículas de N-TiO₂ conferiu uma maior faixa de absorção luminosa e incrementou em cerca de 2,6 vezes a produção de espécies reativas de oxigênio, quando comparada à ftalocianina livre na mesma concentração. O efeito citotóxico das nanopartículas com ftalocianina ocasionou morte celular de mais de 86% nas linhagens testadas, quando submetidas à faixa luminosa de 420-800 nm de comprimento de onda. As nanopartículas sem ftalocianina e a ftalocianina livre, quando expostas a essa mesma faixa luminosa, não inibiram mais do que 10% das células tratadas. Todos esses tratamentos não demonstraram citotoxicidade no escuro, sugerindo que o tratamento só é eficaz quando há a ativação do composto fotossensível na presença de luz⁵⁶. Os resultados obtidos por Pan e colaboradores sugerem um tratamento de alta performance promissor contra, pelo menos, dois tipos de neoplasias. Outros estudos *in vivo* devem ser conduzidos posteriormente para comprovar tal eficácia em animais não humanos e humanos.

Outro trabalho que demonstrou resultados interessantes foi o conduzido por Muehlmann e colaboradores (2015) no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade de Brasília.⁵⁷ Em vez de utilizarem nanopartículas inorgânicas, os pesquisadores formularam uma nanoemulsão contendo o fotossensibilizante ftalocianina misturada em óleo de ricino, formando uma fase oleosa estabilizada na fase dispersante aquosa por uma camada do surfactante Cremophor®, gerando micelas com diâmetro hidrodinâmico médio de 25 nm. Em seguida, trataram células de adenocarcinoma mamário (MCF-7) com essas nanoemulsões e analisaram seu potencial anticâncer no escuro e na exposição à luz monocromática (comprimento de onda = 660 nm). Eles verificaram uma IC₅₀ (concentração necessária para inibir o crescimento de 50% das células) igual a 6,0 nM. Observaram, ainda, que a viabilidade dessas células tumorais diminuiu para 0% na concentração de 93 nM de nanoemulsão, e que a inibição só foi observada quando as células eram irradiadas em 660 nm. Vale ressaltar que a terapia fotodinâmica realizada com a ftalocianina livre não demonstrou atividade significativa contra as células tumorais *in vitro*.

Por último, Wang e colaboradores (2011) executaram um teste *in vivo* em camundongo utilizando nanocristais de NaYF₄ cobertos com o fotossensibilizante Clorina e6 (Ce6) e funcionalizados com PEG, e estudaram a eficácia antitumoral da terapia fotodinâmica (comprimento de onda = 980 nm) em carcinoma mamário murino (4T1) com a administração intratumoral de soro, Ce6 livre e as nanopartículas NaYF₄-Ce6 (diâmetro ~ 30 nm)⁵⁸. Os resultados evidenciaram que a terapia fotodinâmica com Ce6 nanoestruturada se mostrou quase duas vezes mais eficaz que com a Ce6 livre e o controle, após 12 dias de tratamento. Além disso, as nanopartículas foram totalmente excretadas em menos de 2 meses após a administração.

Um estudo clínico utilizando terapia fotodinâmica com resultados promissores foi conduzido por Passos e colaboradores (2012) com pacientes do Hospital Regional da Asa Norte, em Brasília, portadores de queratose actínica, carcinomas basocelulares superficiais e doença

de Bowen (neoplasias de pele)⁵⁹. Sobre as feridas, foram aplicadas nanoemulsões contendo ácido aminolevulínico que, posteriormente, foram expostas à luz de LED no comprimento de onda de 635 nm. O percentual de cura dos pacientes foi superior a 80% após 12 meses de tratamento para as três classes de neoplasias de pele avaliadas.

Todos os exemplos citados de terapia fotodinâmica, utilizando moléculas fotossensibilizantes associadas a nanoestruturas, mostraram resultados promissores na inibição tumoral nos carcinomas cervical, de pele e mamários, *in vitro* e/ou *in vivo*.

2.3.3.3. Hipertermia magnética

De forma resumida, a hipertermia magnética, ou magneto-hipertermia, é o aquecimento gerado pela conversão da energia eletromagnética em energia térmica, quando nanopartículas superparamagnéticas são submetidas a um campo magnético alternado. Células tumorais apresentam maior sensibilidade ao aumento de temperatura, quando comparado com células saudáveis, o que torna essa terapia mais específica à região tumoral⁶⁰. Nessa terapia, nanopartículas magnéticas que atingem a região tumoral são submetidas a um campo magnético alternado. Em resposta, essas nanopartículas alinham-se ao campo magnético e geram calor. A elevação da temperatura em mais de 40° C em células tumorais acarreta a desnaturação de proteínas, que formam agregados e resultam na morte celular por apoptose ou necrose, dependendo do grau de aquecimento e do tamanho do dano causado⁶¹.

Nesse âmbito, serão abordados, a seguir, alguns estudos sobre o tratamento de tumores *in vitro* e *in vivo*, que demonstraram expressiva eficácia utilizando a magnetohipertermia, viabilizada pela distribuição intracelular de nanopartículas magnéticas. Detalhes sobre essa técnica são mais bem explorados no capítulo 7 sobre magneto-hipertermia deste livro.

Dennis e colaboradores (2009) sintetizaram nanocristais de ferrita (Fe_3O_4) recobertos com dextran (diâmetro médio de 96 nm), com a finalidade de estabilização coloidal e melhor biocompatibilidade, e injetaram esse nanossistema na região intratumoral em fêmeas de camundongos portadoras de tumor mamário (MTG-B)⁶². Eles constataram que quanto maior a intensidade do campo magnético, menor foi o tamanho da massa tumoral após a magnetohipertermia, e que, em média, os animais submetidos a uma “intensidade” de campo magnético de 700 Oe não apresentaram crescimento tumoral após 60 dias de tratamento.

Um outro estudo conduzido por Lee e colaboradores (2011) comparou, experimentalmente, os efeitos da magnetohipertermia entre nanopartículas de *core-shell* de $\text{CoFe}_2\text{O}_4\text{-MnFe}_2\text{O}_4$ (15 nm), o Feridex (uma nanopartícula magnética convencional de Fe_3O_4 , 120-180 nm) e os controles: doxorrubicina (quimioterápico convencional), tratamento magnético sem as nanopartículas e animais não tratados⁶³. Os tratamentos foram injetados diretamente no enxerto abdominal de tumor cerebral humano (U87MG) em camundongos. Após uma sessão de magnetohipertermia (500 kHz; $37.3 \text{ kA}\cdot\text{m}^{-1}$) com as nanopartículas *core-shell*, os tumores mostraram remissão total, enquanto, com Feridex e os controles, o volume tumoral progrediu. Isso ocorreu devido a uma maior capacidade de liberação de energia pela nanopartícula *core-shell* do que pelo Feridex.

Uma terceira pesquisa, descrita por Bae e colaboradores (2012), também comparou Feridex a nanocubos ferromagnéticos de óxido de ferro (FIONs) revestidos com quitosana (aprox. 30 nm).⁶⁴ Após a magnetohipertermia local em carcinoma pulmonar (A549), cerca de 90% das células tumorais contendo os nanocubos FIONs morreram por apoptose, contra menos de 20% de morte celular no tratamento com Feridex. Tais nanocubos FIONs também apresentam uma capacidade de liberação de calor maior do que o Feridex, justificando o aumento da eficácia.

2.3.3.4 Terapia combinatória

A terapia combinatória, como o próprio nome sugere, baseia-se em um tratamento que utiliza dois ou mais fármacos, que podem apresentar efeitos aditivos ou sinérgicos entre si, ou seja, o efeito terapêutico final dos fármacos combinados é maior do que os efeitos das drogas isoladas. Isso abre a possibilidade de se combinarem quimioterápicos convencionais, em dosagens menores, a outros compostos bioativos, atingindo uma eficácia igual ou maior que o tratamento convencional^{64,65}.

Alguns nanomateriais têm a capacidade de carrear em uma mesma nanoestrutura duas ou mais substâncias bioativas. Por exemplo, Jiang e colaboradores (2011) formularam lipossomos contendo na sua bicamada apolar o esfingolipídio C6-ceramida, um pró-apoptótico que é naturalmente neutralizado em células cancerosas; lipossomos contendo o inibidor da síntese de glucosilceramida PDMP (D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol), que impede a degradação intracelular de C6-ceramida; e lipossomos com ambos C6-ceramida e PDMP. Eles avaliaram os efeitos solo e combinados de tais formulações a gemcitabina livre, um quimioterápico convencional que interfere na duplicação e na transcrição do DNA em células de câncer pancreático (PANC-1) *in vitro* e *in vivo*.⁶⁵ A concentração para inibir 50% das células PANC-1 (IC50) para o lipossomo contendo apenas C6-ceramida foi equivalente a 2,6% do IC50 para a gemcitabina livre. Os efeitos pró-apoptóticos das terapias combinatórias foram exacerbadamente superiores aos tratamentos isolados, com indução de mais de 60% de apoptose para o lipossomo C6 administrado com gemcitabina, maiores que 50% para o lipossomo contendo C6 e PDMP, e cerca de 90% para o lipossomo contendo ambos C6 e PDMP administrado com a gemcitabina. Por último, o teste *in vivo* evidenciou que os tratamentos combinatórios foram estatisticamente mais eficazes na inibição tumoral.

Em um estudo mais recente, que concatena tanto a terapia combinatória quanto a entrega de ácidos nucleicos, He e colaboradores (2014) conseguiram sintetizar nanodiscos hexagonais (100 nm de diâmetro,

30 nm de espessura) contendo cisplatina e pequenos RNAs interferentes (siRNA) de genes antiapoptóticos para tratar tumores ovarianos resistentes (SKOV-3).⁶⁶ A cisplatina livre, os discos contendo somente a cisplatina e a cisplatina livre combinada aos siRNAs livres tiveram uma eficácia muito menor do que os discos contendo cisplatina conjugados aos siRNAs, os quais reduziram a menos de 20% o total de células viáveis após o tratamento *in vitro*.

Sriraman e colaboradores (2015) desenvolveram lipossomos revestidos com PEG (polietileno glicol) carreadores de NCL-240 (um agente pró-apoptótico) e cobimetinib (inibidor da via das quinases reguladas por sinais extracelulares, MEK/ERK), para avaliar a atividade antitumoral em HCT 116 (câncer de cólon) dessas duas moléculas combinadas⁶⁷. Os resultados demonstraram atividade sinérgica devido à combinação dessas moléculas, que interromperam o ciclo celular na fase G1, e induziram a apoptose com uma eficácia 3 a 4 vezes maior do que os grupos-controle (fármacos separados livres, fármacos separados nanoestruturados, fármacos combinados livres e células não tratadas).

Mais uma vez, esses estudos evidenciam o importante papel da nanobiotecnologia no incremento de terapias antitumorais, servindo como uma plataforma de carregamento e encapsulação de fármacos que, juntos, são muito mais eficazes.

Além dos exemplos de abordagens nanotecnológicas investigados para o tratamento de câncer já citados nos tópicos acima, outros exemplos são citados na **Tabela 4**, de modo a complementar o panorama explicado nos parágrafos anteriores.

Tabela 4. Exemplos de sistemas nanoestruturados investigados para o tratamento de câncer

Nanomaterial	Tipo de Câncer	Método Empregado	Taxa de Sucesso	Referência
Micelas poliméricas (Gal-CH-PCL) carregadas com curcumina	Carcinoma hepatocelular humano (HepG2)	Entrega de composto bioativo	Capacidade até 6 vezes maior de induzir morte celular em HepG2 em comparação à curcumina livre	[48]
Nanoemulsão à base de tamoxifen	Mama (HTB-20)	Entrega de fármaco	Inibição da multiplicação celular 20 vezes maior e aumento da taxa de apoptose em 4 vezes	[49]
Dendrímeros peptídicos contendo doxorubicina	Mama (4T1)	Entrega de fármaco	Os dendrímeros carregados com doxorubicina induziram uma taxa de apoptose das células tumorais quase 5 vezes maior do que o fármaco livre, administrados in vivo	[50]
N-TiO ₂ + ftalocianina	Câncer cervical (HeLa) e carcinoma nasofaríngeo (KB)	Terapia fotodinâmica	As nanopartículas de titânio dopadas com nitrogênio e funcionalizadas com ftalocianina não só facilitaram a entrada da ftalocianina nas células tumorais como aumentaram em 2,6 vezes a produção de espécies reativas de oxigênio	[56]
Nanoemulsão à base de ftalocianina	Mama (MCF-7)	Terapia fotodinâmica	Enquanto a ftalocianina livre não demonstrou eficácia, esse mesmo composto nanoencapsulado respondeu à terapia fotodinâmica e afetou significativamente a viabilidade das células tumorais in vitro	[57]
CoFe ₂ O ₄ -MnFe ₂ O ₄	Enxerto de tumor cerebral (U87MG)	Hipertermia magnética	Remissão completa do tumor in vivo em 16 dias de tratamento	[63]
Nanocubos ferromagnéticos estabilizados por quitosana	Pulmão (A549)	Hipertermia magnética	Durante o período de 6 dias de tratamento, o tumor diminuiu em 30% o seu volume, in vivo	[64]
Lipossomos de C6-ceramida e PDMP	Pâncreas (PANC-1)	Terapia combinatória	A combinação de C6-ceramida com o inibidor da neutralização de ceramidas (PDMP) permitiu que a ceramida realizasse sua atividade pró-apoptótica contra as células PANC-1	[65]
Nanodiscos metálicos dopados com cisplatina e funcionalizados com siRNAs	Ovário (SKOV-3)	Terapia combinatória	Inibição de mais de 80% das células tumorais, in vitro, na concentração de 150 μM por 72 horas de incubação	[66]
Nanocápsula polimérica poli(metil vinil éter-co-maleico anidrido) com selo e doxorubicina	Mama (4T1)	Terapia combinatória	Nanoestrutura contendo doxorubicina não reduziu o tumor, in vivo, em comparação com a doxorubicina livre. Entretanto, a nanoestrutura diminuiu a cardiotoxicidade	[68]

PDMP: D-threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol.

Fonte: elaborada pelos autores.

2.3.4 Nanoteranósticos: diagnóstico e terapia em um mesmo nanossistema

Outra possibilidade que a nanobiotecnologia proporciona é a combinação de compostos para diagnóstico com moléculas terapêuticas em uma mesma plataforma nanométrica. Esse tipo de sistema é chamado “nanoteranóstico” (**Tabela 5**). Eles permitem rastrear em tempo real a localização dos nanocompósitos terapêuticos, para que seja confirmada a internalização celular ou a sua chegada ao tumor, por exemplo.

Nanohíbridos magnetopoliméricos multifuncionais (MMPNs) foram arquitetados e sintetizados por Yang e seu grupo (2007), os quais eram constituídos de um núcleo de nanocristais magnéticos (ferrita) e o quimioterápico doxorrubicina, conferindo a capacidade de imageamento por ressonância magnética e quimioterapia, respectivamente; recobertos com blocos copoliméricos de PLGA-PEG-COOH e o anticorpo anti-HER, conferindo o direcionamento alvo-específico a células tumorais que expressam o receptor HER-2, como o carcinoma mamário⁶⁹. Eles conseguiram demonstrar uma expressiva eficácia desse nanossistema como agente de contraste para a detecção por imagem do tumor e, também, a inibição da proliferação tumoral por meio da associação de efeitos da quimioterapia com o direcionamento mediado por anticorpo.

Complementarmente, Zhang e colaboradores (2012) sintetizaram nanobastões de ouro recobertos com sílica mesoporosa carregando o quimioterápico doxorrubicina.⁷⁰ O ouro em forma de nanobastão tem a capacidade de imageamento eficiente e a propriedade de superaquecer quando irradiado com laser de comprimento de onda específico. Para complementar, a doxorrubicina, incorporada na casca de sílica mesoporosa, tem propriedades quimioterápicas conhecidas. Dessa forma, esse nanocompósito proporciona o diagnóstico por imageamento e o tratamento tanto fototérmico quanto quimioterápico, com eficácia de aproximadamente 70% na diminuição da viabilidade celular em A549 (células de tumor pulmonar humano), 20% maior do que o tratamento com a doxorrubicina livre.

Similarmente a esse trabalho, Chen et al. (2014) sintetizaram nanopartículas de gadolínio revestidas com albumina plasmática humana e funcionalizadas com um corante fluorescente (IR825, que é excitado em comprimento de onda próximo ao infravermelho), e testaram sua eficácia contra células metastáticas de câncer mamário murino (4T1) alojadas em linfonodos, quando submetidas à terapia fototérmica (geração de calor iniciada pela incidência de laser sobre uma nanopartícula fotossensível)⁷¹. Dessa forma, o gadolínio atuou como agente fotossensível na terapia fototérmica, enquanto o corante auxiliou no rastreamento por imagem da nanopartícula, quando o sistema foi irradiado. A eficácia do tratamento foi dependente da dosagem de fótons irradiados sobre as nanopartículas, que, ao serem absorvidos pelo gadolínio, culminaram na conversão da energia luminosa em energia térmica, acarretando hipertermia e ablação celular.

Como último exemplo, mas não menos interessante, Quintana e colegas (2002) realizaram um estudo no qual foram sintetizados dendrímeros poliméricos (PAMAM) de quinta geração, e a eles foram acopladas moléculas de folato, fluoresceína e metrotexato (quimioterápico), que conferiram a esse nanomaterial a capacidade de direcionamento alvo-específico às células KB (carcinoma epidermoide de boca), a capacidade de rastreamento intracelular e de tratamento quimioterápico, respectivamente⁷². Dessa forma, a terapia mostrou uma eficácia *in vitro* dezenas de vezes maior do que a terapia com o quimioterápico livre.

Conclui-se que os “nanoteranósticos” aqui apresentados se mostraram plataformas eficazes no rastreamento tumoral e no combate de tumores, simultaneamente.

Tabela 5. Exemplos de nanossistemas utilizados como “nanoteranósticos” em câncer

Nanomaterial	Tipo de Câncer	Método Empregado	Taxa de Sucesso	Referência
Nano-híbridos magneto-poliméricos multifuncionais (MMPNs)	Mama	Imageamento por ressonância magnética, quimioterapia com doxorubicina, e direcionamento pela funcionalização com anti-HER	Taxa de crescimento tumoral cerca de 3 vezes menor, quando tratado com o nano-híbrido	[69]
Nanobastões de Au revestidos com sílica mesoporosa para carregamento de doxorubicina	Pulmão (A549)	Imageamento por ressonância plasmônica de superfície localizada, entrega de quimioterápico e possibilidade de terapia fototérmica	A viabilidade das células tumorais caiu para 20% após tratamento com os nanobastões, associado a irradiação de laser (próximo ao infravermelho) por 8 minutos	[70]
Nanopartículas de gadolínio revestidas com albumina e funcionalizadas com a fluorescência IR825	Mama (4T1)	Terapia fototérmica pela ativação do gadolínio e imageamento por fluorescência	Viabilidade das células tumorais caiu para 10% após tratamento com as nanopartículas associadas à irradiação de intensidade 1,5 W/cm ²	[71]
Nanoemulsão acoplado à molécula de folato carregando docetaxel	Ovário (SKOV3)	Entrega de fármaco e imageamento por ressonância magnética	O docetaxel encapsulado em nanoemulsão acoplado ao folato apresentou citotoxicidade 3,3 vezes maior, comparando com o docetaxel livre	[73]

Fonte: elaborada pelos autores.

2.4 Fármacos antineoplásicos nanoestruturados disponíveis no mercado e os desafios da nanomedicina

Atualmente, já existem alguns fármacos antineoplásicos nanoestruturados, aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e por órgãos regulamentadores de outros países, disponíveis para comercialização. Temos como exemplos: Abraxane[®], Doxil[®], DaunoXome[®], Marqibo[®], Onyvide[®], Myocet[®], Mepact[®], SMANCS[®], Genexol-PM[®] e Nanotherm[®].⁷⁴

O Abraxane[®] é uma nanopartícula proteica constituída pelo quimioterápico paclitaxel encapsulado em albumina humana, utilizado como tratamento contra as neoplasias em estágio avançado de pulmão, mama e pâncreas⁷⁴. Já como exemplos de formulações lipossomais, temos⁷⁴:

- **Doxil**[®], funcionalizado com PEG e encapsulando o quimioterápico doxorubicina. Utilizado na quimioterapia contra câncer ovariano e contra sarcoma de Kaposi relacionado à AIDS;
- **DaunoXome**[®], contém o quimioterápico daunorrubicina e é utilizado no tratamento de sarcoma de Kaposi;
- **Marqibo**[®], contém o quimioterápico vincristina, que é adotado na terapia contra a leucemia linfoblástica aguda;
- **Onyvide**[®], lipossomos revestidos com PEG carregam o quimioterápico irinotecan e são aplicados contra o câncer pancreático metastático;
- **Myocet**[®], lipossomo contendo o quimioterápico doxorubicina, não revestido com PEG, aplicado no tratamento de câncer mamário metastático; e
- **Mepact**[®], contendo muramil tripeptídeo fosfatidiletanolamina, utilizado no tratamento de osteossarcoma.

Há, também, os nanofármacos poliméricos carreadores de quimioterápicos convencionais: SMANCS[®] e Genexol-PM[®]. O primeiro é uma nanopartícula composta por poli (estireno-co-malato) associada ao fármaco neocarzinostatin, aplicada no tratamento de câncer hepático ou renal. O segundo é uma micela polimérica de PEG e PLA contendo paclitaxel, utilizada no tratamento de câncer de pulmão e de mama⁷⁴. Por último, o NanoTherm[®] é uma suspensão de nanopartículas de óxido de ferro utilizada na magnetohipertermia contra glioblastoma. Esses fármacos apresentam menores efeitos adversos, porém ainda compartilham alguns efeitos adversos que estão associados às terapias convencionais.

Uma grande crítica que é feita a respeito de nanofármacos é que há um grande número de pesquisas-piloto, porém poucas conseguem passar por todos os testes clínicos e chegar ao mercado, devido a dificuldades para passar nos testes de regulamentação e a questões mercadológicas. E mesmo após chegar ao mercado, alguns fármacos como o Bexxar[®] e o Mylotarg[®] foram dele retirados por obterem baixa

adesão de pacientes ao fármaco ou por demonstrarem um aumento do número de óbitos após o tratamento.

É preciso que haja uma maior preocupação dos pesquisadores em nanobiotecnologia desde a elaboração dos seus projetos, sobre os requisitos para a aprovação e comercialização de futuros fármacos nanoestruturados, sobre a importância de se focar em materiais e estratégias com um maior potencial terapêutico e com menores toxicidade e danos potenciais ao meio ambiente. Com isso, deve-se dar prioridade a materiais biodegradáveis, biocompatíveis, renováveis e alvo-específicos ao se elaborar uma nova estratégia nanobiotecnológica de diagnóstico, tratamento ou prevenção antitumoral.

3. Referências Bibliográficas

1. O QUE É O CÂNCER? Instituto Nacional do Câncer (INCA). Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322>. Acesso em: 25 ago. 2018.
2. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert A. Biological hallmarks of cancer. In: BAST JR, Robert C. et al. **Holland-Frei Cancer Medicine**. 9 ed. New Jersey: JohnWiley & Sons, 2017. Cap. 2, p.7-16.
3. CANCER: FACT SHEET. Organização Mundial da Saúde (OMS). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em: 20 mai. 2018.
4. COMO PREVENIR O CÂNCER. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/prevencao-fatores-de-risco/como-prevenir-cancer>> . Acesso em: 25 ago. 2018.
5. BU, H. et al. A TPGS-incorporating nanoemulsion of paclitaxel circumvents drug resistance in breast cancer. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 471, n. 1-2, p.206–213, ago. 2014.
6. FALAGAN-LOTSCH, Priscila; GRZINCIC, Elissa M.; MURPHY, Catherine J. New Advances in Nanotechnology-based Diagnosis and Therapeutics for Breast Cancer: An Assessment of Active-Targeting Inorganic Nanoplatfoms. **Bioconjugate Chemistry**, v. 28, n. 1, p.135-152, dez. 2016.
7. WHAT IS NANOTECHNOLOGY. National Nanotechnology Initiative, 2009. Disponível em: <<http://www.nano.gov/html/facts/whatIsNano.html>>. Acesso em: 25 ago. 2018.

8. PÉREZ-HERRERO, Edgard; FERNÁNDEZ-MEDARDE, Alberto. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 93, n. 1, p.52-79, jun. 2015.
9. ESTANQUEIRO, M. et al. Nanotechnological carriers for cancer chemotherapy: the state of the art. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 126, n. 1, p.631-648, fev. 2015.
10. WICKI, A. et al. J. Nanomedicine in cancer therapy: Challenges, opportunities, and clinical applications. **Journal of Controlled Release**, v. 200, n. 1 p.138–157, fev. 2015.
11. ROSENBLUM, D. et al. Progress and challenges towards targeted delivery of cancer therapeutics. **Nature communication**, v. 9, n. 1410, p.1-12, dez. 2018.
12. LEMBO, David; CAVALLI, Roberta. Nanoparticulate delivery systems for antiviral drugs. **Antiviral Chemistry and Chemotherapy**, v. 21, n. 2, p.53–70, dez. 2010.
13. NAZIR, S. et al. Nanomaterials in combating cancer: Therapeutic applications and developments. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 10, n. 1, p. 19-34, jan. 2014.
14. HUANG, R. F. S. et al. Inhibition of colon cancer cell growth by nanoemulsions carrying gold nanoparticles and lycopene. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, n. 1, p.2823–2846, abr. 2015.
15. HU, X. et al. Multifunctional hybrid silica nanoparticles for controlled doxorubicin loading and release with thermal and pH dual response. **Journal of Materials Chemistry B**, v. 1, n. 8, p.1109-1118, jan. 2013.

16. WILHELM, S. et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **Nature reviews/materials**, v. 1, n. 16014, p.1-12, abr. 2016.
17. KUMAR, Gannu P.; DIVYA, Ajmeera. Nanoemulsion based targeting in cancer therapeutics. **Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 5, p.272-284, jun. 2015.
18. EL-GOGARY, R. I. et al. Polyethylene glycol conjugated polymeric nanocapsules for targeted delivery of quercetin to folate-expressing cancer cells in vitro and in vivo. **ACS Nano**, v. 8, n. 2, p.1384-1401, jan. 2014.
19. YAMEEN, B. et al. Insight into nanoparticle cellular uptake and intracellular targeting. **Journal of Controlled Release**, v. 190, n. 1, p.485-499, set. 2014.
20. SINGH, S. K. et al. Drug delivery approaches for breast cancer. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, n. 1, p.6205–6218, ago. 2017.
21. MELANCON, M. P. et al. Selective Uptake and Imaging of Aptamer- and Antibody-Conjugated Hollow Nanospheres Targeted to Epidermal Growth Factor Receptors Overexpressed in Head and Neck Cancer. **ACS Nano**, v. 8, n. 5, p.4530–4538, mai. 2014.
22. LIANG, M. et al. H-ferritin–nanocaged doxorubicin nanoparticles specifically target and kill tumors with a single-dose injection. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 41, p.14900-14905, set. 2014.
23. ALI, M. R. K. et al. Targeting cancer cell integrins using gold nanorods in photothermal therapy inhibits migration through affecting cytoskeletal proteins. **PNAS plus**, v. 114, n. 28, p.5655–5663, jul. 2017.

24. TANG, R. et al. Tunable Ultrasmall Visible-to-Extended Near-Infrared Emitting Silver Sulfide Quantum Dots for Integrin-Targeted Cancer Imaging. **ACS Nano**, v. 9, n. 1, p.220–230, jan. 2015.
25. BEHZADI, S. et al. Cellular uptake of nanoparticles: journey inside the cell. **Chemical Society Reviews**, v. 46, n. 14, p.4218-4244, jun. 2017.
26. JOANITTI, Graziella A. et al. Nanostructured systems for the organelle-specific delivery of anticancer drugs. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 17, n. 3, p.224-236, 2017.
27. SUEN, Wai-Leung. L.; CHAU, Ying. Size-dependent internalisation of folate-decorated nanoparticles via the pathways of clathrin and caveolae-mediated endocytosis in ARPE-19 cells. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 4, p.564–573, abr. 2013.
28. ALLARD-VANNIER, E. et al. Folic acid-capped PEGylated magnetic nanoparticles enter cancer cells mostly via clathrin-dependent endocytosis, **BBA - General Subjects, Tours**, v. 1861, n. 6, p.1578-1586, nov. 2016.
29. GAO, H. et al. Ligand modified nanoparticles increases cell uptake, alters endocytosis and elevates glioma distribution and internalization. **Scientific reports**, v. 3, n. 2534, p.1-8, ago. 2013.
30. LI, Y. et al. Lipid rafts-mediated endocytosis and physiology-based cell membrane traffic models of doxorubicin liposomes. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1858, n. 8, p.1801–1811, ago. 2016.
31. SPORN, Michael B. Approaches to prevention of epithelial cancer during the preneoplastic period. **Cancer Research**, v. 36, n. 7, p.2699–2702, jul. 1976.

32. DEFELICE, Stephen L., The nutraceutical revolution: its impact on food industry R&D. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, n. 2, p.59-61, fev. 1995.
33. SIDDIQUI, I. A. et al. Resveratrol nanoformulation for cancer prevention and therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1348, n. 1, p.20–31, jun. 2015.
34. SIDDIQUI, Imtiaz A.; SANNA, Vanna. Impact of nanotechnology on the delivery of natural products for cancer prevention and therapy. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 60, n. 6, p.1330–1341, mar. 2016.
35. ARORA, Divya; JAGLAN, Sundeep. Nanocarriers Based Delivery of Nutraceuticals for Cancer Prevention and Treatment: A Review of Recent Research Developments, **Trends in Food Science & Technology**, v. 54, n. 1, p.114-126, abr. 2016.
36. SIDDIQUI, I. A. et al. Introducing Nanochemoprevention as a Novel Approach for Cancer Control: Proof of Principle with Green Tea Polyphenol Epigallocatechin-3-Gallate. *Cancer Research*, v. 69, n. 5, p.1712–1716, fev. 2009.
37. SANNA, V. et al. Targeted nanoparticles encapsulating (–)-epigallocatechin-3-gallate for prostate cancer prevention and therapy. **Scientific Reports**, v. 7, n. 41573, p.1-15, fev. 2017.
38. KRISHNAN, Samaya R.; GEORGE, Suraj K. Nanotherapeutics in Cancer Prevention, Diagnosis and Treatment. In: WALDMAN, Scott A; TERZIC, Andre. **Pharmacology and Therapeutics**, 1.ed. Philadelphia: Saunders, 2008. Cap. 8, p.235-253.

39. AMERICAN CANCER SOCIETY. **Limitations of Mammograms**. Artigo do site da Sociedade Americana do Câncer (American Cancer Society). Disponível em: <https://www.cancer.org/cancer/breast-cancer/screening-tests-and-early-detection/mammograms/limitations-of-mammograms.html#written_by>. Acesso em: 25 ago. 2018.

40. PENG, G. et al. Detection of lung, breast, colorectal, and prostate cancers from exhaled breath using a single array of nanosensors. **British Journal of Cancer**, v. 103, n. 1, p.542-551, jul. 2010.

41. ZHANG, C. et al. Single-quantum-dot-based DNA nanosensor. **Nature Materials**, v. 4, n. 1, p.826-831, out. 2005.

42. KIM, Kyoung S.; PARK, Wooram; NA, Kun. Gadolinium-chelate nanoparticle entrapped human mesenchymal stem cell via photochemical internalization for cancer diagnosis. **Biomaterials**, v. 36, n. 1, p.90-97, jan. 2015.

43. PAN, X. et al. Enhancement of the photokilling effect of aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy by conjugating with nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, n. 1, p.292-298, jun. 2015.

44. VALSECCHI, C. et al. Low-cost leukemic serum marker screening using large area nanohole arrays on plastic substrates. **ACS Sensors**, v. 1, n. 9, p.1103-1109, ago. 2016.

45. PERGUNTAS e respostas sobre quimioterapia. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/8e973c004eb686f794f896f11fae00ee/perguntas_qt.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=8e973c004eb686f794f896f11fae00ee> . Acesso em: 25 ago. 2018.

46. PERGUNTAS e respostas sobre radioterapia. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/d028e6804eb686f9950497f11fae00ee/perguntas_rx.pdf?MOD=AJPERES&CACHEID=d028e6804eb686f9950497f11fae00ee> . Acesso em: 25 ago. 2018.
47. WANG, Andrew Z.; LANGER, Robert; FAROKHZAD, Omid C. Nanoparticle Delivery of Cancer Drugs. **Annual Review of Medicine**, v. 63, n. 1, p.185–198, set. 2012.
48. ZHOU, N. et al. Galactosylated chitosan–polycaprolactone nanoparticles for hepatocyte-targeted delivery of curcumin. **Carbohydrate Polymers**, v. 94, n. 1, p.420– 429, abr. 2013.
49. TAGNE, J. et al. A nanoemulsion formulation of tamoxifen increases its efficacy in a breast cancer cell line. **Molecular Pharmaceutics**, v. 5, n. 2, p.280-286, jan. 2008.
50. ZHANG, C. et al. Peptide dendrimer-Doxorubicin conjugate-based nanoparticles as an enzyme-responsive drug delivery system for cancer therapy. **Advanced Healthcare Materials**, v. 3, n. 8, p.1299-1308, abr. 2014.
51. WANG, X. X. et al. The use of mitochondrial targeting resveratrol liposomes modified with a dequalinium polyethylene glycol-distearoylphosphatidyl ethanolamine conjugate to induce apoptosis in resistant lung cancer cells. **Biomaterials**, v. 32, n. 24, p.5673-5687, ago. 2011.
52. SAMPAIO, Marina C. **Desenvolvimento e caracterização de nanoemulsões à base de óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) para avaliação de efeitos biológicos em células de câncer de mama *in vitro***. 2017. 87 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2017.

53. OMBREDANE, Alicia Simalie. **Síntese verde de nanopartículas de prata a partir de extrato aquoso do tubérculo de *Curcuma longa* L. associadas à quitosana e avaliação da atividade anti-tumoral in vitro em câncer de pele não melanoma (linhagem A431)**. 2016. 146 f. Dissertação (Mestrado em Nanociência e Nanobiotecnologia) - Universidade de Brasília, Brasília, 2016.
54. CALIXTO, G. M. F. et al. Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. **Molecules**, v. 21, n. 342, p.1-18, mar. 2016.
55. HONG, Eun J.; CHOI, Dae G.; SHIMN, Min S. Targeted and effective photo dynamic therapy for cancer using functionalized nanomaterials. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 6, n. 4, p.297–307, jul. 2016.
56. PAN et al. Enhancement of the photokilling effect of aluminum phthalocyanine in photodynamic therapy by conjugating with nitrogen-doped TiO₂ nanoparticles. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 130, n. 292, p.292-298, jun. 2015.
57. MUEHLMANN, L. A. et al. Aluminium-phthalocyanine chloride nanoemulsions for anticancer photodynamic therapy: Development and in vitro activity against monolayers and spheroids of human mammary adenocarcinoma MCF-7 cells. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 13, n. 36, p.1-11, mai. 2015.
58. WANG, C. et al. Near-infrared light induced in vivo photodynamic therapy of cancer based on up conversion nanoparticles. **Biomaterials**, v. 32, n. 26, p.6145-6154, set. 2011.
59. PASSOS, Simone Karst. **Terapia fotodinâmica com ácido 5-amino-levulínico em nanoemulsão no tratamento de queratoses actínicas e câncer de pele não melanoma: estudo clínico**. 2012. 124 f. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2012.

60. LIMA-TENÓRIO, M.K. et al. Magnetic nanoparticles: In vivo cancer diagnosis and therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v.493, n. 1-2, p.313–327, set. 2015.
61. KAMPINGA, Harm H. Cell biological effects of hyperthermia alone or combined with radiation or drugs: A short introduction to newcomers in the field. **International Journal of Hyperthermia**, v. 22, n. 3, p.191-196, mai. 2006.
62. DENNIS, C. L. et al. Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia. **Nanotechnology**, v. 20, n. 39, p.395103-395110, set. 2009.
63. LEE, J. H et al. Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 1, p.418-422, jun. 2011.
64. BAE, K. H. et al. Chitosan oligosaccharide-stabilized ferrimagnetic iron oxide nanocubes for magnetically modulated cancer hyperthermia. **ACS Nano**, v. 6, n. 6, p.5266–5273, mai. 2012
65. JIANG, Y. et al. Combinatorial therapies improve the therapeutic efficacy of nanoliposomal ceramide for pancreatic cancer. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 7, p.574-585, oct. 2011.
66. HE, C. et al. Nanoscale metal–organic frameworks for the co-delivery of cisplatin and pooled siRNAs to enhance therapeutic efficacy in drug-resistant ovarian cancer cells. **Journal of the American Chemical Society**, v. 136, n. 14, p.5181–5184, mar. 2014.
67. SRIRAMAN, S. K. et al. Cytotoxicity of PEGylated liposomes co-loaded with novel pro-apoptotic drug NCL-240 and the MEK inhibitor cobimetinib against colon carcinoma in vitro. **Journal of Controlled Release**, v. 220, n. 1, p.160-168, oct. 2015.

68. GANASSIN, R. et al. Selol nanocapsules with a poly (methyl vinyl ether-co-maleic anhydride) shell conjugated to doxorubicin for combinatorial chemotherapy against murine breast adenocarcinoma in vivo. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, v. 29, n. 1, p.1-8, mai. 2018.
69. YANG, J. et al. Multifunctional magneto-polymeric nanohybrids for targeted detection and synergistic therapeutic effects on breast cancer. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 46, n. 1, p.8836-8839, nov. 2007.
70. ZHANG, Z. et al. Mesoporous silica-coated gold nanorods as a light-mediated multifunctional theranostic platform for cancer treatment. **Advanced Materials**, v. 24, n. 1, p.1418-1423, fev. 2012.
71. CHEN, Q. et al. An albumin-based theranostic nano-agent for dual-modal imaging guided photothermal therapy to inhibit lymphatic metastasis of cancer post- surgery. **Biomaterials**, v. 35, n. 34, p.9355-9362, ago. 2014.
72. QUINTANA, A. et al. Design and function of a dendrimer-based therapeutic nanodevice targeted to tumor cells through the folate receptor. **Pharmaceutical Research**, v. 19, n. 9, p.1310-1316, set. 2002.
73. GANTA, S. et al. Formulation development of a novel targeted theranostic nanoemulsion of docetaxel to overcome multidrug resistance in ovarian cancer. **Drug Delivery**, v. 23, n. 3, p.958-970, jun. 2016.
74. SHI, J. et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. **Nature Reviews: Cancer**, v. 17, n. 1, p.20-37, nov. 2017.

CAPÍTULO 7

Magneto-hipertermia aplicada ao tratamento do câncer

Ailton Sousa-Junior¹; Harley Rodrigues^{1,2}; Marcus Carrião¹; Elisângela Silveira-Lacerda³; Andris Bakuzis^{1,*}

1. Histórico

A *magneto-hipertermia*, também conhecida como hipertermia magnética (HM), consiste em um aumento controlado de temperatura, dentro de uma faixa terapêutica de interesse, como consequência da interação dos momentos de dipolo magnéticos de nanopartículas magnéticas com um campo magnético alternado externo aplicado a estas¹⁻³. A dissipação de energia térmica pode ocorrer tanto pelo mecanismo conhecido como *relaxação de Néel-Brown*⁴⁻⁶, em que o momento magnético da nanopartícula rotaciona internamente, sem necessariamente girar a nanopartícula, quanto por atrito entre as nanopartículas, em movimento de rotação, e o líquido carreador onde estão dispersas, sob a influência do campo externo, mecanismo conhecido como *relaxação de Brown*^{7,8}. Nos dois mecanismos, a geração de calor acontece por causa do surgimento de uma curva de histerese, na faixa de frequência terapêutica (100-300 kHz), fenômeno às vezes denominado *histerese dinâmica*⁹⁻¹². A eficiência desses dois mecanismos de relaxação depende de propriedades *intrínsecas*, tais como tamanho, magnetização, anisotropia e polidispersão das nanopartículas consti-

1. Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Brasil

2. Instituto Federal de Goiás, Brasil

3. Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Brasil

* E-mail: bakuzis@ufg.br

tuintes do fluido magnético; e *extrínsecas*, tais como a frequência e a amplitude do campo magnético externo aplicado, além da viscosidade do meio e da camada de cobertura molecular aderida à superfície das nanopartículas para garantir sua estabilidade coloidal.

A ideia de usar o fenômeno de dissipação histerética em materiais magnéticos para gerar calor e tratar o câncer não é nova. Em 1957, o cirurgião Robert Gilchrist e seus colaboradores do St. Luke's Hospital (Chicago, Illinois) publicaram resultados de um estudo pioneiro (*post mortem*) com cães que apresentavam carcinoma colorretal metastático¹³. Foi observado que a ressecção dos tumores desses cães não era capaz de eliminar as metástases alojadas nos linfonodos do tecido retroperitoneal. Os pesquisadores fizeram injeções em diferentes regiões afetadas pelo tumor no corpo dos cães, utilizando um fluido magnético polidisperso contendo nanopartículas de maguemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) com diâmetros na faixa de 20–100 nm (injeções nos tecidos subserosos, subcutâneo e subperitoneal), na expectativa de que as nanopartículas pudessem ser carregadas pelo sistema linfático e se acumular nos linfonodos doentes. Análises histopatológicas das áreas injetadas e das áreas de drenagem linfática comprovaram a presença de nanopartículas magnéticas nos linfonodos da camada subserosa do intestino dos animais (na concentração de 5 mg/g de partículas no linfonodo). Aproximando uma bobina dessas peças anatômicas, os pesquisadores realizaram sua hipertermia magnética *ex vivo*, aplicando um campo alternado com amplitude na faixa de 200–240 Oe (15,9–19,0 kA/m) e frequência de 1,2 MHz, promovendo um aumento de 14,0 °C em 3 minutos de aplicação. O monitoramento da temperatura foi realizado em apenas um ponto, com um termômetro de coluna de álcool (muito grande para aferir temperaturas num tumor *in vivo*). Eles concluíram que o tamanho e a concentração das nanopartículas no tecido a ser tratado, bem como a eficiência do aquecimento, eram inadequados para o tratamento das metástases *in vivo*. Nenhum experimento *in vivo* foi realizado, pelo temor de que os animais pudessem sofrer prejuízos à sua saúde, tais como queimaduras na pele causadas por *eddy currents*, dadas a amplitude e a frequência do campo magnético utilizado. Toda-

via, diante da clara necessidade de um procedimento mais eficiente do que a simples excisão cirúrgica do tumor principal, deixando para trás metástases, e a despeito das limitações tecnológicas e conceituais de sua época, Gilchrist *et al.* preconizaram com bastante otimismo, há cerca de 60 anos, a possibilidade de *delivery* sistêmico passivo de nanopartículas magnéticas a nodos metastáticos de uma neoplasia maligna, para sua posterior utilização em magneto-hipertermia localizada, o que abriu caminho para futuras aplicações em carcinomas metastáticos de mama, estômago, colorretal, bexiga e próstata¹³.

Infelizmente, até a presente data, a entrega exclusiva de calor mediada por hipertermia magnética ainda não parece capaz de tratar metástases, apesar de diversos avanços obtidos ao longo dessas décadas. De fato, a hipertermia magnética somente prosperou a partir da década de 1990, quando a nanotecnologia começou a se desenvolver de forma mais madura, como resultado de melhores métodos de síntese de nanoestruturas, de manutenção da estabilidade coloidal e também por meio de técnicas de caracterização mais avançadas, como microscópios de alta resolução, entre eles o HR-TEM (*High Resolution Transmission Electron Microscopy* ou Microscopia Eletrônica de Transmissão de Alta Resolução) ou ainda o AFM (*Atomic Force Microscopy* ou Microscopia de Força Atômica), entre outros. Independentemente disso, a área de Medicina Térmica, que utiliza o calor para tratamento de doenças, cresceu significativamente, desenvolvendo importantes equipamentos, inclusive vários já aprovados e utilizados na clínica, como aqueles para ablação por radiofrequência (RF), por micro-ondas, ou ainda o ultrassom focalizado de alta intensidade (conhecido como HIFU)¹⁴⁻²⁰. Há no mercado, já aprovados pelo FDA (*Food and Drug Administration*, agência reguladora norte-americana), equipamentos que combinam a hipertermia (nesse caso, promovida por antenas de micro-ondas) e a ressonância magnética para o monitoramento da entrega de calor de forma tridimensional²¹. Obviamente, essa tecnologia e métodos terapêuticos foram inspirados no entendimento dos mecanismos físicos de geração de calor.

2. Mecanismos físicos da hipertermia magnética

A chave para a compreensão do fenômeno de hipertermia magnética está na descrição da interação da radiação eletromagnética (representada especificamente nesta aplicação pelo campo magnético alterado) com a matéria. Os campos magnéticos e elétricos são descritos pelas equações de Maxwell: um conjunto de equações que relacionam as propriedades físicas desses campos e dos meios pelos quais se originam. Em condições específicas, esses campos propagam-se pelo espaço na forma de ondas eletromagnéticas, carregando uma determinada energia.

A densidade de energia “armazenada” nos campos que compõem uma onda eletromagnética é descrita pelo teorema de Poynting. O resultado da interação de uma onda eletromagnética que penetra uma determinada região do espaço dependerá das características dessa região ou do material que o preenche (permeabilidade, permissividade, condutividade, cargas elétricas etc.). É possível demonstrar que, de maneira geral, quando um meio material sofre a ação de um campo eletromagnético variável no tempo (campo elétrico \vec{E} e magnético \vec{B}), há geração de calor nesse meio (δQ) devido ao trabalho (dW) realizado pelo campo externo sobre a amostra, convertendo energia eletromagnética em energia térmica da seguinte forma²²:

$$\oint_{\text{ciclo}} \delta Q = \oint_{\text{ciclo}} dW = \int_V \left(\oint_{\text{ciclo}} \vec{E} \cdot \vec{J} dt - \oint_{\text{ciclo}} \vec{P} \cdot d\vec{E} - \oint_{\text{ciclo}} \mu_0 \vec{M} \cdot d\vec{H} \right) dV,$$

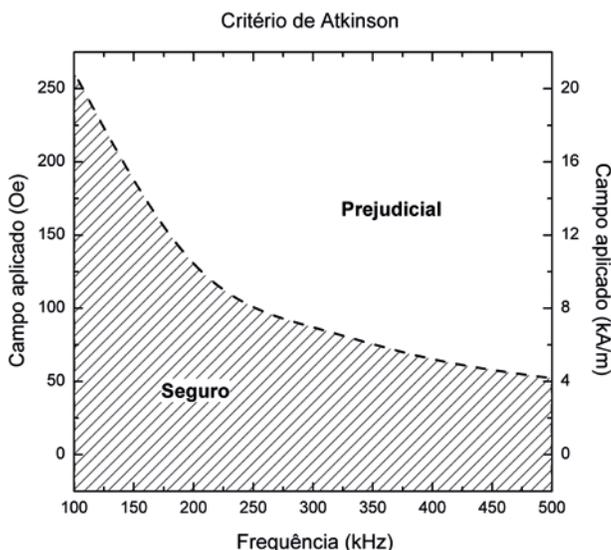
em que \vec{J} é a densidade de corrente elétrica no meio material devida a portadores de carga livres, \vec{P} é o vetor polarização elétrica do material, \vec{M} é o vetor magnetização do material e dV é um elemento infinitesimal de volume da amostra. O primeiro termo no lado direito da equação

acima descreve a interação do campo externo com as cargas elétricas livres presentes no meio. Esse termo é identificado como o termo de *dissipação resistiva* por correntes parasitas (ou por *eddy currents*), relacionada ao efeito Joule. O segundo termo relaciona a interação do campo com os dipolos elétricos e é chamado de termo de *dissipação dielétrica*. O último termo caracteriza a *dissipação histerética magnética*, dada pela interação do campo magnético com os momentos de dipolo magnéticos da amostra. Para o projeto de aplicações biomédicas da hipertermia magnética, é preciso se concentrar na primeira e na terceira contribuições.

No caso de sistemas biológicos, foco da atenção aqui, as cargas elétricas discutidas acima correspondem principalmente aos íons do meio fisiológico. A interação desses íons com o campo alternado induz a geração de correntes elétricas de Foucault, correntes parasitas ou *eddy currents*, aquecendo, por efeito Joule de forma “difusa”, toda a região exposta ao campo e, portanto, de forma não específica. Essa dissipação resistiva pode ser útil, por exemplo, na ablação de tumores sólidos por radiofrequência (RF), em que o campo elétrico oscilante (na faixa de 450–500 kHz), aplicado diretamente por uma antena, acelera, na forma de corrente elétrica, íons (K^+ , Na^+ e Cl^-) do tecido tumoral em contato com os eletrodos metálicos²³. Esse é um dos principais limitadores do desenvolvimento de equipamentos e protocolos para aplicações clínicas da hipertermia magnética. Como a própria expressão sugere, a intensidade desse processo de aquecimento depende das características do campo, sobretudo amplitude e frequência, escalando, na realidade, com o quadrado desses parâmetros. Diferentemente do que ocorre, por exemplo, no caso de exames de Imagiamento por Ressonância Magnética (IRM), em que existem diretrizes orientadoras (*guidelines*) determinadas pelo FDA e que suportam sua aplicação na clínica médica, ainda não há *guidelines* para a técnica de hipertermia magnética com nanopartículas estabelecendo critérios de segurança. Na maioria dos resultados publicados *in vivo* (estudos pré-clínicos e clínicos), é adotado um limiar para o produto da intensidade de campo pela frequência igual a $4,85 \times 10^8 \text{ A}/(\text{m}\cdot\text{s})$ ^{24,25}, acima do qual podem

haver prejuízos para a saúde do paciente. Oleson, por exemplo, registrou que o aquecimento por *eddy currents* pode causar a formação de bolhas na pele quando esse limite é ultrapassado²⁶. Este critério foi definido na literatura por Atkinson *et al.*, em 1984, após avaliar clinicamente relatos de sensações subjetivas de desconforto devido a intenso aquecimento, em pacientes que tiveram a região do tórax submetida a um campo magnético alternado com frequência constante de 13,56 MHz e várias amplitudes de campo magnético, sendo o raio da bobina de aplicação do campo da ordem de 15 cm. Em seus resultados, eles identificaram que o produto $4,85 \times 10^8 \text{ A}/(\text{m}\cdot\text{s})$ era tolerado pelos pacientes testados²⁴. A **Figura 1** mostra a relação entre o campo e a frequência críticos, segundo o critério de Atkinson, para uma bobina de raio 3,5 cm.

Figura 1: Critério de Atkinson. Relação entre a amplitude e a frequência críticas para aplicação de campos alternados a pacientes.



Fonte: adaptada de CARRIÃO, 2016²⁷.

Como será visto mais adiante, o fenômeno de dissipação histerética é mais eficiente para campos com amplitude e frequência elevadas. Entretanto, para aplicação *in vivo* de hipertermia magnética, existe um limite prático para essas características da radiação não ionizante aplicada. O primeiro sistema de hipertermia magnética com nanopartículas para aplicação em humanos foi desenvolvido pela empresa alemã MagForce AG. Segundo ela, o NanoActivator[®] pode ser utilizado para a aplicação de campo magnético alternado em qualquer região do corpo humano, com intensidade ajustável na faixa de 2–15 kA/m (de 25,1–188,5 Oe) e frequência de 100 kHz, tendo recebido, em abril de 2016, a aprovação regulamentar europeia (CE *conformity marking*) para o início de tratamentos comerciais em colaboração com o hospital universitário Charité, na capital Berlim. Em 2015, também recebeu autorização do FDA, nos Estados Unidos, para a realização de estudos clínicos em pacientes com tumor de próstata na cidade de Seattle, Washington²⁸. Como será discutido na próxima seção, essa técnica vem sendo utilizada para o tratamento de tumores malignos de alto risco no cérebro, como o glioblastoma multiforme e, também, para o tratamento do câncer de próstata, ambos tratados em associação com a braquiterapia.

Diante das limitações impostas pela dissipação resistiva, é necessário compreender e maximizar a eficiência do processo de dissipação histerética para projetar tratamentos eficazes baseados em hipertermia magnética. A primeira descrição de hipertermia magnética foi inspirada na descrição de Debye para a perda dielétrica²⁹. Essa metodologia leva à Teoria da Resposta Linear (TRL)^{30,31}, teoria com boa concordância com resultados experimentais no regime de campo baixo. Apesar de todas as suas limitações, a TRL fornece informações importantes sobre o fenômeno da hipertermia magnética. Ela antecipa corretamente que a eficiência de calor depende das propriedades do campo (amplitude e frequência) e das nanopartículas (magnetização de saturação, tamanho, anisotropia e fator de amortecimento, ou *damping*). Existem outras abordagens para a descrição de hipertermia magnética baseadas em *loops* de Rayleigh (para nanopartículas multidomínio); teorias baseadas no modelo de Sto-

ner-Wohlfarth; soluções numéricas da equação de Landau-Lifshitz-Gilbert; e o método de Monte Carlo Cinético^{9,10,12,32}. Cada teoria tem seu intervalo e condições de validade, mas modelos analíticos como a TRL são simples e intuitivos, tornando-os muito atraentes.

Como a nanociência é uma área de pesquisa relativamente nova, só recentemente os resultados experimentais possibilitaram informações para melhorar esse modelo. Em 2002, Rosensweig incluiu o efeito da dispersão de tamanho na TRL, o que representa um passo importante, já que a maioria das amostras estudadas em hipertermia é polidispersa³⁰. Em 2013, Branquinho *et al.* modificaram o termo de anisotropia, incluindo a interação dipolar entre nanopartículas no quadro da TRL³³. Esse foi outro importante avanço para aplicações de terapia oncológica, considerando que as condições dentro dos sistemas biológicos favorecem a agregação, o que aumenta o efeito da interação dipolar. Cabe ressaltar que esse tema, na verdade, continua ainda sob intenso debate científico³⁴.

No entanto, em todas essas abordagens, apenas nanopartículas uniformes são discutidas, o que parece não ser adequado para materiais nanoestruturados. De um modo geral, mesmo nanoestruturas homogêneas (constituídas de apenas um tipo de material) são não uniformes, já que os átomos da superfície respondem diferentemente ao campo, em comparação com átomos mais internos da nanopartícula. Em 2016, Carrião e Bakuzis descreveram um modelo *core-shell* para levar em conta as possíveis diferenças entre a superfície e o volume, tendo incluído essa possibilidade à TRL³⁵. Basicamente, a TRL propõe que a resposta magnética de um material a um campo magnético alternado a ele aplicado seja linear, ou seja, tenha a mesma forma funcional (nesse caso, de uma função harmônica senoidal), mas fora de fase com a excitação. Esse atraso provoca uma *histerese* que resulta em dissipação de energia, daí o termo *dissipação histerética*.

Na TRL, considerando o caso mais simples, de uma partícula homogênea, a densidade volumétrica de energia dissipada por um material magnético é dada por³⁰:

$$P = \mu_0 \pi \chi_0 f H_0^2 \frac{2\pi f \tau}{1 + (2\pi f \tau)^2},$$

em que μ_0 é a permeabilidade magnética do vácuo; f e H_0 são a frequência e a amplitude do campo, respectivamente; χ_0 e τ são a susceptibilidade quasi-estática³⁶ e o tempo de relaxação do material magnético, respectivamente. O ponto mais relevante para a compreensão do fenômeno de dissipação histerética é compreender de onde surge o “atraso” na resposta magnética do material: o fenômeno de *relaxação*, caracterizado na expressão acima pela variável τ . Como discutido anteriormente, existem dois processos de relaxação por meio dos quais uma nanopartícula magnética dissiparia calor sob ação do campo alternado: a *relaxação de Brown* (em homenagem a Robert Brown) e a *relaxação de Néel-Brown* (em homenagem aos cientistas Louis Néel e William Fuller Brown Jr.). No primeiro caso, o momento magnético da partícula, fixado a uma direção preferencial característica do cristal (anisotropia magnética), tende a alinhar-se ao campo, promovendo a rotação da partícula. Trata-se, portanto, do movimento de uma partícula em um fluido, sujeita aos mecanismos de fricção e ao processo de dissipação de energia a ela associado⁷. No segundo caso, o momento magnético é compelido a mudar de direção dentro na nanopartícula, modificando a orientação da magnetização do próprio material, vencendo a barreira anisotrópica e dissipando energia nesse processo^{4,37}. Esses dois fenômenos podem ocorrer simultaneamente em uma amostra, a depender das características das nanopartículas presentes e do meio no qual estão dispersas. O tempo de relaxação geral, incluindo os dois fenômenos, obedece à equação:

$$\frac{1}{\tau} = \frac{1}{\tau_B} + \frac{1}{\tau_N},$$

em que τ_B representa o tempo de relaxação de Brown, que depende da viscosidade η do meio no qual a partícula se move, do volume hidrodinâmico da partícula V_H , da constante de Boltzmann k e da temperatura T , sendo dado pela equação:

$$\tau_B = \frac{3\eta V_H}{kT}.$$

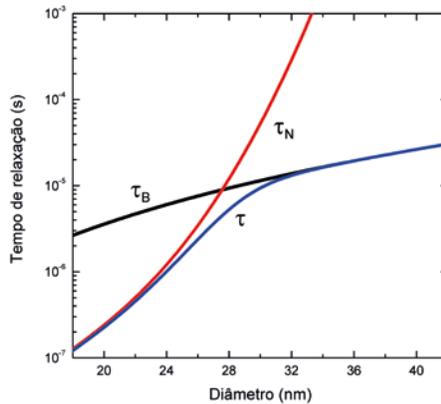
Já τ_N representa o tempo de relaxação de Néel-Brown, que depende, basicamente, da razão σ entre a energia anisotrópica (dada pelo produto da constante de anisotropia k pelo volume da partícula V) e a energia térmica (dada pelo produto da constante de Boltzmann pela temperatura). Existem várias formas funcionais para o tempo de relaxação de Néel-Brown, que variam de acordo com as considerações sobre o tipo de anisotropia, mas, para o caso mais simples e comumente descrito (anisotropia uniaxial, para σ maior que 2 e com o tempo de relaxação independente do campo³⁸), ele pode ser escrito como:

$$\tau_N = \frac{\tau_0 e^\sigma}{2\sigma^{1/2}},$$

em que τ_0 é o “tempo de relaxação (ou difusão) da magnetização livre”, característico do material e depende da magnetização de saturação, da constante de anisotropia e do fator de *damping*. A partir dessas equações, vê-se que, no caso do processo de relaxação de Brown, a dissipação depende das características morfológicas da nanopartícula e da viscosidade do meio. Por outro lado, para a relaxação de Néel-Brown, a dissipação depende tanto de parâmetros morfológicos (tamanho e dispersão de tamanho) quanto de magnéticos (magnetização, anisotropia e *damping*). Apesar de terem naturezas distintas e eventualmente estarem simultaneamente relacionados à dissipação em sistemas de nanopartículas magnéticas submetidas a campos alternados, o tempo característico da rotação dos momentos magnéticos por ação de cada um desses fenômenos pode ser muito distinto e, em geral, um deles se sobrepõe ao outro, como pode ser visto na **Figura 2**.

Naturalmente, embora a TRL “pura” não explicita, outros fatores influenciam a eficiência de dissipação dos sistemas magnéticos em análise. A interação entre as nanopartículas, suas formas (se muito diferentes da esférica), a organização em cadeias e aglomerados (como estruturas esféricas ou fractais)^{34,39} e a sua composição^{33,40,41} são alguns exemplos. Independentemente da origem dessa dissipação e da influência desses fatores, ainda que se conheça e se possa simular todo o processo de geração de calor nessas nanopartículas em meio biológico, existem ainda enormes desafios pela frente, como a descrição do processo de difusão do calor (inclusive na escala nanométrica) e dos efeitos dessa dissipação nos sistemas biológicos. Entretanto, em vista das aplicações biomédicas da hipertermia, sobretudo na oncologia, toda a descrição desses mecanismos serve, unicamente, para fornecer à *equação de biocalor* uma descrição da fonte de calor utilizada.

Figura 2: Tempo de relaxação magnética. Comparação entre os tempos de relaxação de Brown e Néel-Brown para partículas magnéticas esféricas



Fonte: adaptada de BRANQUINHO, 2014⁴².

3. Propagação de calor em meios biológicos

O cálculo exato da quantidade de calor entregue volumetricamente ao tumor (durante um procedimento de hipertermia magnética) demanda, além da determinação experimental da eficiência magnetotérmica *in vivo*, o conhecimento preciso da localização das fontes de calor dentro do tumor, ou seja, o mapeamento tridimensional do volume ocupado pelas nanopartículas magnéticas (NPMs). Esse é um problema central na utilização da técnica de magneto-hipertermia para o tratamento de neoplasias objetivando sua aplicação na clínica médica: a determinação precisa (e em tempo real) da dose térmica entregue volumetricamente⁴³.

No que diz respeito aos fenômenos que envolvem a geração e a transferência de calor em tecidos biológicos vivos, há dois fenômenos principais: a geração celular de calor metabólico; e a troca de calor entre o sangue em escoamento e o tecido circundante⁴⁴. Em 1948, Harry H. Pennes publicou os resultados de um extenso trabalho experimental sobre a distribuição radial da temperatura no antebraço humano em função da diferença de temperatura entre o sangue arterial e o tecido muscular⁴⁵. Em parte, seu objetivo era avaliar a aplicabilidade das equações de fluxo de calor (tão utilizadas para o estudo de materiais em engenharia) no contexto de seus resultados experimentais em termos da produção local de calor de tecidos biológicos vascularizados. Entre suas principais contribuições, Pennes sugeriu que a taxa temporal de calor (\dot{Q}_p) trocado entre o sangue e os tecidos é diretamente proporcional ao produto da taxa de perfusão volumétrica do sangue (ω_b , dada em m^3/s , considerando o escoamento de sangue por metro cúbico de tecido) pela diferença entre a temperatura do sangue arterial (T_b) e a temperatura local dos tecidos (T)⁴⁶:

$$\dot{Q}_p = \rho_b c_b \omega_b (T_b - T)$$

No SI, \dot{Q}_p é representado em watts (W), e os parâmetros ρ_b e c_b são a densidade (kg/m^3) e o calor específico do sangue ($\text{J}/(\text{kg}\cdot^\circ\text{C})$), respectivamente. Em seu trabalho pioneiro, ele modificou a equação de condução de calor, incluindo, além do termo de perfusão (\dot{Q}_p), também um termo de potência térmica devida ao calor metabólico produzido pelas reações bioquímicas que ocorrem em nível celular nos tecidos vivos (\dot{Q}_{met} , dado em W no SI). De maneira geral, o problema teórico, portanto, consiste em obter uma solução para a equação diferencial de condução de biocalor de Pennes^{45,46}, a qual modela a taxa temporal de variação da temperatura num meio biológico, ou seja, resolver a equação:

$$\rho_n c_n \frac{\partial T_n}{\partial t} = \vec{\nabla} \cdot (\kappa_n \vec{\nabla} T_n) + \rho_b c_b \omega_b (T_b - T_n) + \dot{Q}_{met} + \dot{Q}_{hist}$$

Na equação acima, o subíndice (n) faz diferença entre os tecidos em consideração (tumor ou tecidos normais) enquanto ρ_n , c_n , κ_n são, respectivamente, a densidade do tecido, seu calor específico e sua condutividade térmica. O primeiro termo no lado direito dessa equação representa a difusão de calor no meio. O último termo (\dot{Q}_{hist}) denota a potência térmica volumétrica dissipada pelas nanopartículas interagindo com um campo magnético externo alternado (mecanismo de perda histerética), a qual está diretamente relacionada à densidade volumétrica de energia dissipada por um material magnético (P). Obviamente, esse último termo deve ser considerado apenas no tumor, caso as nanopartículas tenham sido injetadas nele. Além disso, é relevante observar que a equação de biocalor é bastante complexa e, em geral, resolvida apenas por métodos numéricos sofisticados. Nesse caso, sendo necessário, além da inclusão das condições de contorno adequadas ao problema biológico, deve-se ainda levar em conta efeitos da temperatura na perfusão sanguínea do tumor e de tecidos saudáveis⁴⁷. Obviamente, a discussão teórica apresentada até o presente momento ressalta a grande complexidade associada ao monitoramento da dose térmica durante o procedimento terapêutico de hipertermia magnética. Portanto, é fundamental que haja o monitoramento da entrega de calor,

em tempo real, durante o procedimento terapêutico, visando a garantir que a dose térmica planejada seja aquela recebida pelo paciente.

Atualmente, os trabalhos mais promissores publicados na literatura sobre o monitoramento não invasivo e em tempo real da dose térmica (na clínica médica) têm utilizado a técnica de imageamento termográfico por ressonância magnética, que, por exemplo, já é realidade na prática clínica de ablação de tumores sólidos em humanos por HIFU e também na ablação por terapia fototérmica (nesse caso, a geração de calor é resultado da interação de radiação eletromagnética com os elétrons da nanoestrutura, resultando numa perda dielétrica)^{23(pp181-182)}. Contudo, essa é também uma modalidade de termometria muito cara e não compatível com todas as formas de terapia térmica para o tratamento de cânceres, em particular para o caso da hipertermia com nanopartículas magnéticas, já que a alta intensidade do campo magnético do ímã utilizado no equipamento de ressonância magnética não permite a rotação dos momentos magnéticos das nanopartículas magnéticas, conseqüentemente, impossibilitando a geração de calor^{43,48}. Independentemente da necessidade de se monitorar em tempo real a dose térmica, vários grupos no mundo vêm utilizando a técnica de hipertermia magnética para o tratamento de tumores, seja em estudos pré-clínicos, seja no tratamento de pacientes.

4. Resultados pré-clínicos e clínicos

4.1 Resultados pré-clínicos

Estudos pré-clínicos *in vivo* demonstrando a eficácia da hipertermia magnética iniciaram-se no final da década de 1990. Em 1999, Jordan *et al.*⁴⁹ divulgaram resultados usando nanopartículas à base de magnetita, com diâmetros da ordem de 10 nm, submetidas a um campo magnético alternado de 500 kHz de frequência e amplitude de 10 kA/m (aproximadamente 125,7 Oe). O modelo xenográfico estudado foi o C3H, um carcinoma mamário induzido em camundongos. O material magnético foi injetado de forma intratumoral. Os animais foram tratados por 30 minutos e, em alguns deles, a temperatura intratumoral relatada

foi da ordem de 47°C. Na comparação com animais de controle (não tratados), é clara a diminuição na velocidade de crescimento tumoral dos camundongos após a hipertermia magnética. Além disso, parece haver animais com aparente remissão tumoral completa, apesar de tal resposta biológica não ser evidenciada pelos pesquisadores.

Em 2001, Hilger *et al.*⁵⁰ investigaram a possibilidade de ablação térmica utilizando nanopartículas de magnetita. O modelo tumoral foi o MX-1, num estudo com 10 camundongos. Temperaturas intratumorais de até 70°C foram reportadas, em tratamentos de 4 min, com campo magnético alternado de 400 kHz de frequência e 6,5 kA/m de amplitude. Foram injetados intratumoralmente 21 mg de material magnético. Todos os animais foram sacrificados após os tratamentos.

Em 2006, Kobayashi *et al.*⁵¹ investigaram o efeito da magneto-hipertermia usando magnetolipossomas (vesículas da ordem de 100 nm contendo nanopartículas de magnetita). O grupo relatou estudos em diversos modelos tumorais: B16, MM46, Os515, Vx-7 e T-9. Particularmente, neste último modelo (um glioma), um estudo com a indução de dois tumores (localizados em posições diametralmente opostas no abdômen do camundongo) foi realizado usando um campo magnético alternado de 384 Oe (aproximadamente 30,6 kA/m) e frequência de 118 kHz. Diferentemente dos estudos anteriores, nanopartículas magnéticas foram injetadas em apenas um dos dois tumores. De acordo com os autores, apesar de apenas um dos tumores ter recebido o tratamento, 28 dias após a hipertermia magnética, observou-se remissão completa dos dois tumores em um dos animais. Assim, a morte de células tumorais via calor induziu uma forte resposta imune no hospedeiro. A superexpressão de proteínas chaperonas de estresse térmico (as HSPs, do inglês *heat shock proteins*) por células neoplásicas durante a hipertermia influenciou respostas imunes antitumorais, de acordo com os autores. Estudos recentes têm discutido esse importante resultado na perspectiva de uma futura aplicação da magneto-hipertermia como uma espécie de “vacina” no combate ao câncer⁵²⁻⁵⁴.

Em 2009, Ivkov *et al.*⁵⁵ observaram remissão completa em 75% dos animais tratados com uma nanopartícula comercial (BNF), sob campo magnético de alta amplitude (700 Oe, aproximadamente 55,7 kA/m) e frequência de 150 KHz. O modelo tumoral murino adotado foi o MTG-B (carcinoma mamário). Os camundongos foram seguidos por 60 dias, e a dose de nanopartículas injetada intratumoralmente foi de 5 mg/cm³ de Fe no tumor.

Em 2011, Lee *et al.*⁴¹ investigaram os efeitos da hipertermia magnética utilizando nanopartículas magnéticas do tipo *core-shell*. O estudo envolveu 3 animais, o modelo tumoral murino U87MG e um campo magnético de amplitude 37,3 kA/m e 500 kHz de frequência. De acordo com os autores, apenas 75 µg de nanopartículas *core-shell* de CoFe₂O₄-MnFe₂O₄ foram injetados intratumoralmente. Os camundongos foram seguidos por apenas 26 dias, tendo apresentado remissão tumoral completa nesse período. Apesar do curto período de observação, na comparação com os animais de controle negativo (sem tratamento) e com os animais de controle positivo (tratados com o quimioterápico doxorubicina), fica clara a maior eficácia da magneto-hipertermia no tratamento tumoral. O potencial terapêutico de nanopartículas magnéticas do tipo *core-shell* é realmente animador e tem sido o foco de diversos trabalhos da literatura, inclusive trabalhos do Grupo de Nanomagnetismo da UFG³⁵.

Em 2014, Candido *et al.*⁵⁶ observaram remissão tumoral completa em 100% dos animais tratados com hipertermia magnética mediada por nanopartículas de magueta (γ -Fe₂O₃) funcionalizadas com tripolifosfato. Primeiramente, células de uma linhagem de carcinoma de células escamosas orais (UM-SCC14A, carcinoma oral humano) foram expostas a diferentes concentrações de nanopartículas de γ -Fe₂O₃-tripolifosfato *in vitro*: 3,5×10¹⁴, 7,0×10¹⁴ e 1,4×10¹⁵ partículas por mililitro. As culturas foram sujeitas a testes de proliferação celular (MTT), apoptose e à microscopia eletrônica de transmissão. A concentração de 7,0×10¹⁴ partículas por mililitro não apresentou citotoxicidade significativa nos testes de proliferação celular (MTT) e foi, por esse motivo, escolhida

para os testes *in vivo* envolvendo 30 *hamsters* da Síria. Os animais foram divididos em 5 grupos de 6 indivíduos: um grupo de controle, para o qual não houve indução tumoral; e 4 grupos de animais com tumores orais, induzidos com o auxílio do carcinógeno DBMA. Dos 4 grupos de animais com tumores, 2 passaram pelo tratamento por hipertermia magnética, com campo magnético de frequência 1 MHz e de amplitude de 40 Oe (aproximadamente 3,2 kA/m), durante 15 min. Um desses 2 grupos de tratamento foi eutanasiado após 24h. O outro grupo foi acompanhado por 7 dias, tendo recebido mais duas sessões de hipertermia. Os animais não demonstraram sinais de toxicidade nem comportamentos anormais. Todos os 12 animais (100%) submetidos ao tratamento por magneto-hipertermia apresentaram remissão tumoral completa, fato comprovado pelas análises histopatológicas e imuno-histoquímicas⁵⁶. Entretanto, cabe ressaltar que a análise foi feita em tempo curto, apenas 7 dias, e não há relato do monitoramento dos animais tratados por um tempo mais longo.

A **Tabela 1** traz um resumo dos resultados pré-clínicos de magneto-hipertermia apresentados nos parágrafos anteriores. Fica claro o grande potencial dessa terapia oncológica, mas algumas observações referentes a esses dados precisam ser ressaltadas. Em diversos casos da literatura, inclusive os discutidos neste capítulo, a condição experimental fere o critério de Atkinson, ou seja, em princípio, não está nas condições para uso em seres humanos, já que se encontra na região prejudicial, gerando calor de forma não específica por *eddy currents*. De fato, a maior parte dos trabalhos da literatura tem focado na síntese de nanopartículas magnéticas que geram o calor de forma mais eficiente, na maior parte das vezes em campo alto, conseqüentemente sem analisar a condição limitante biológica. Entretanto, a questão mais relevante a ser analisada refere-se à necessidade de obter a maior eficiência magnetotérmica dentro do limite biológico, isto é, respeitando o critério de Atkinson³⁵. Portanto, o sucesso dessa terapia em seres humanos deveria estar associado a desenvolver nanomateriais biocompatíveis, biodegradáveis e que, em termos magnéticos, respondam bem a baixas amplitudes de campo magnético.

Tabela 1. Sumário com alguns dos resultados pré-clínicos mais relevantes das duas últimas décadas no tratamento de tumores sólidos via magneto-hipertermia

Grupo	Animais	Modelo Tumoral	NPMs	H (kA/m)	f (kHz)	Massa de NPMs injetada	Aquecimento tumoral	Dias após HM	Resposta biológica
Jordan et al. 1999 ⁴⁹	$n = 20$	C3H carcinoma mamário	Fe ₃ O ₄ -Aminosilane (10 nm) Fe ₃ O ₄ -Dextrana (3 nm)	10	500	—	47°C mantido por 30 min	~ 50	RP ¹
Hilger et al. 2001 ⁵⁰	$n = 10$	MX-1 adeno carcinoma	Fe ₃ O ₄ (10–280 nm)	6,5	400	21 mg/g de tumor	de 43–71°C em 3,5 min	—	Encolhimento do tumor e RC ²
Kobayashi et al. 2006 ⁵¹	—	B16, MM46, OS515, Vx-7 e T-9	Magnetolipossomas catiônicos (150 nm) cheios de NPM de Fe ₃ O ₄ (10 nm)	30,6	118	—	de 43–45 °C em 20 min	—	RC (tumor T-9) devido a HM + resposta imunitária
Ivkov et al. 2009 ⁵⁵	$n = 4$	MTG-B carcinoma mamário	Fe ₃ O ₄ -BNF (50 nm)	55,7	150	5 mg/cm ³ de tumor	de 40,5–55 °C em 15 min	60	75% de RC
Lee et al. 2011 ⁴¹	$n = 3$	U87MG neoplasia cerebral	Core-shell (15 nm) (CoFe ₂ O ₄ -MnFe ₂ O ₄)	37,3	500	75 µg	Temperatura não informada 10 min de HM	26	Encolhimento do tumor e aparente RC
Candido et al. 2014 ³⁶	$n = 6$	UM-SCC14A carcinoma oral	γ -Fe ₂ O ₃ -Triplifostato (8 nm)	3,2	1.000	—	Temperatura não informada 15 min/dia por 3 dias	7	100% de RC

¹RP = remissão parcial do tumor, ²RC = remissão completa do tumor.

Fonte: tabela adaptada de RODRIGUES, 2017⁵⁷.

4.2 Resultados clínicos

A utilização da magneto-hipertermia na clínica médica já é uma realidade em alguns centros de excelência na Europa e nos Estados Unidos. Entretanto, ela tem sido utilizada em associação com outras técnicas, como a radioterapia e a braquiterapia, já que o limite biológico impossibilita a aplicação de campos magnéticos mais intensos. No tratamento de tumores malignos cerebrais de alto risco, como o glioblastoma multiforme, tem-se empregado a magneto-hipertermia em associação com a radioterapia. No tratamento de câncer de próstata, tem-se associado a magneto-hipertermia à braquiterapia de baixa taxa de dose (LDR, do inglês *Low Dose Rate*). A aplicação clínica da magneto-hipertermia é, todavia, recente, com os resultados mais relevantes surgindo a partir da década de 2000, como resultado do desenvolvimento pela empresa alemã MagForce AG do primeiro sistema de hipertermia magnética para aplicação em humanos, o NanoActivator^{®28}.

Em 2007, Johannsen *et al.*^{58,59} publicaram resultados de um estudo clínico de fase I envolvendo 10 pacientes (faixa etária de 62–79 anos) com tumores de próstata recorrentes. A prostatectomia radical de resgate já não era possível para alguns desses pacientes, e os demais se recusavam a fazê-la. A média e a mediana dos volumes tumorais eram, respectivamente, iguais a 19,1 cm³ e 15,8 cm³, volumes determinados por tomografia computadorizada e por imagiamento por ressonância magnética. Todos os tumores já haviam sido tratados anteriormente via uma ou mais terapias (prostatectomia radical, quimioterapia, radioterapia externa, braquiterapia de alta ou baixa taxa de dose e terapia hormonal). Antes da primeira sessão de hipertermia, 6 desses pacientes possuíam níveis de PSA (*prostate-specific antigen*) aumentados (entre 5,9 ng/ml e 19,1 ng/ml); para os outros 4 pacientes, os níveis de PSA estavam entre 0,8 ng/ml e 3,0 ng/ml. Todos receberam injeções intratumorais de um fluido magnético (dispersão aquosa na concentração de 112 mg/ml) com nanopartículas de 15 nm de diâmetro (caroço de magnetita Fe₃O₄, revestido por uma camada de cobertura de aminosilane). A mediana do volume de fluido magnético injetado foi de 11,4 mL. O acesso ao tumor na próstata do paciente foi guiado por

ultrassom. Os pacientes tiveram seus tratamentos anteriores interrompidos e foram submetidos a 6 sessões de hipertermia magnética com duração de 60 min cada, uma vez por semana, sob campo magnético alternado de frequência igual a 100 kHz e amplitude inicialmente igual a 2,5 kA/m, aumentada até que o paciente relatasse sensações subjetivas de desconforto, tais como intenso aquecimento e desconforto nas regiões da virilha e do períneo. Campos de amplitude entre 4,0 kA/m e 5,0 kA/m foram bem tolerados por todos os pacientes.

O monitoramento da temperatura foi realizado em tempo real, mas de maneira invasiva, com a introdução de quatro termômetros de fibra-óptica nos tumores. Considerando os 10 pacientes, o valor médio das temperaturas máximas intratumorais foi igual a 43,5°C (variando de 41,4–51,3°C), sendo que um dos pacientes chegou a acessar 55°C em ao menos um dos quatro pontos monitorados. A temperatura intratumoral a ser acessada durante os 60 min de magneto-hipertermia foi calculada numericamente supondo uma taxa de perfusão sanguínea constante na solução da equação de difusão de biocalor de Pennes⁴⁶. O cálculo levou em conta um mapeamento do volume ocupado pelas nanopartículas dentro do tumor de cada paciente, conforme determinado por tomografia computadorizada antes de cada sessão. Também foi estimado o valor da eficiência magneto-térmica (representada na literatura como SLP, *Specific Loss Power*, ou SAR, *Specific Absorption Rate*) das nanopartículas *in vivo*, por paciente, tendo-se obtido uma mediana igual a 115 W/kg. A mediana dos valores de temperatura intratumoral calculados tridimensionalmente para os percentis T_{20} , T_{50} e T_{90} (isto é, a temperatura excedida, respectivamente, por 20%, 50% e 90% do volume da próstata aquecida) foram, respectivamente, 41,1°C (no intervalo de 40,0–47,4°C), 40,8°C (no intervalo de 39,5–45,4°C) e 40,1°C (no intervalo de 38,8–43,4°C).

Para determinar uma correlação entre o efeito cumulativo da entrega de calor após sucessivas sessões de hipertermia, foi calculado, para cada paciente, o valor da dose térmica (CEM43) ao final dos 6 tratamentos: a média e a mediana do valor de CEM43T90 foram,

respectivamente, iguais a 20,9 min e 7,8 min^{59,60} (para uma discussão sobre dose térmica, sugere-se a leitura do trabalho de van Rhooon *et al.*⁴³ e dos artigos ali citados). Esse estudo clínico seguiu os 10 pacientes por mais de um ano e sua resposta biológica ao tratamento (nos primeiros 4,5 meses após a hipertermia) incluiu um declínio de 25% até 70% nos níveis de PSA de oito pacientes, o que pareceu estar correlacionado a temperaturas intratumorais mais elevadas e à distribuição mais homogênea das nanopartículas⁵⁸.

Posteriormente, em 2010, Johannsen *et al.*⁶⁰ publicaram outros resultados clínicos de fase I envolvendo 8 novos pacientes, também com carcinoma de próstata recorrente, tratados com hipertermia magnética combinada com braquiterapia-LDR (sementes de iodo-125 foram implantadas, conjuntamente com a injeção de nanopartículas magnéticas). Seguindo o mesmo protocolo de hipertermia do estudo anterior, nesse segundo grupo, de terapia combinada, os autores obtiveram medianas de $T_{90} = 39,3^{\circ}\text{C}$ e $\text{CEM43T90} = 5,8$ min. Essas foram doses térmicas adequadas para o tratamento combinado, mas seriam insuficientes para o tratamento usando apenas a hipertermia magnética.

Outro resultado interessante da literatura, que também ilustra a eficiência da técnica de magneto-hipertermia no tratamento de tumores sólidos complexos e de alto risco foi publicado em 2011, por Maier-Hauff *et al.*⁶¹, encerrando um estudo clínico de fase II com 59 pacientes portando carcinoma cerebral de glioblastoma multiforme recorrente. A expectativa média de vida desses pacientes era maior ou igual a 3 meses, e o tamanho de cada tumor não ultrapassava 7 cm de diâmetro. Dos 59 indivíduos, 23 tinham idade inferior a 50 anos e 54% eram homens. Todos os tumores já haviam sido tratados anteriormente, alguns por mais de um tipo de terapia: 56 cirurgicamente (ressecção); 58 haviam passado por radioterapia; e 51 por quimioterapia.

Cada paciente recebeu uma injeção intratumoral do mesmo tipo de fluido magnético utilizado nos experimentos anteriores⁵⁹ de Johannsen *et al.* (nanopartículas de Fe_3O_4 -aminosilane), mas o diâmetro das

nanopartículas presentes no fluido era um pouco menor (12 nm). A mediana do volume injetado foi de 4,5 mL, correspondendo a uma concentração de 0,28 mL/cm³ de fluido magnético no tumor. Essa injeção envolvia um procedimento cirúrgico minimamente invasivo, guiado por ultrassom, de perfuração do crânio para acesso ao tumor localizado no cérebro do paciente. Todos os pacientes foram tratados empregando duas sessões de 60 min de magneto-hipertermia por semana, durante 6 semanas (totalizando 720 min de aquecimento). A hipertermia magnética foi combinada com administrações de radioterapia, com a mediana das doses administradas tendo sido igual a 30 Gy, fracionadas em 5 × 2 Gy por semana, antes (ou depois) da hipertermia. Intensidades de campo magnético (com frequência igual a 100 kHz) no intervalo de 3,8–13,5 kA/m eram bem toleradas por todos os pacientes, com relatos de alguns efeitos colaterais: durante a hipertermia 50% dos pacientes apresentaram sudorese branda; 47% relataram sensação de aquecimento e desconforto na região tratada; 13,6% tiveram dores de cabeça brandas; em 3 pacientes, ao menos uma de suas sessões teve de ser abortada devido à dor intensa (provavelmente resultante do aumento da pressão intracranial devido ao aquecimento local); em 9,1% a temperatura corpórea chegou a 38°C. Por meio do mesmo acesso utilizado para a injeção das nanopartículas magnéticas, foi introduzido um termômetro de fibra-óptica no tumor de cada paciente para o monitoramento em tempo real da temperatura intratumoral. A mediana dos valores de temperatura intratumoral máxima registrada (em um único ponto) nos 59 pacientes foi igual a 51,2°C (sendo que um deles registrou um máximo de 82,0°C)⁶¹.

A estimativa tridimensional da temperatura intratumoral (em função do tempo de hipertermia magnética) foi realizada utilizando o mesmo protocolo de Johannsen *et al.*⁵⁹, discutido nos parágrafos anteriores. A resposta biológica à terapia combinada de radioterapia e hipertermia magnética foram medianas de sobrevida iguais a 13,4 meses após o segundo diagnóstico positivo de glioblastoma (todos os pacientes com tumores recorrentes) e igual a 23,2 meses após o primeiro diagnóstico positivo – um aumento, respectivamente, de 7,6 meses e de 8,6 meses

na comparação com resultados da literatura envolvendo pacientes tratados apenas por quimioterapia (atual modalidade de eleição na clínica médica)^{23,61}.

No tratamento de tumores sólidos por terapias térmicas, em qualquer que seja a técnica utilizada, o monitoramento *in vivo* da temperatura intratumoral (em tempo real) é um ponto crítico: 1) para a delimitação precisa da região aquecida e preservação de tecidos saudios; 2) para a determinação das distribuições de temperatura intratumorais (devido à não homogeneidade na entrega de calor); 3) para a validação da eficiência do procedimento, principalmente dos efeitos de resposta biológica ao tratamento em termos da dose térmica equivalente, ou seja, para a identificação de um limiar de temperatura e tempo de aquecimento necessários para provocar danos irreversíveis aos tecidos^{43,62,63}.

Atualmente, a modalidade de eleição na clínica médica para a realização de termometria tridimensional intratumoral, de forma precisa, não invasiva e não ionizante, é a técnica de imagiamento por ressonância magnética, empregada durante a hipertermia (ou ablação) de tumores sólidos fibrosos por HIFU (*High Intensity Focused Ultrasound*)^{20,23(p181)}, por radiofrequência^{14,64} ou por micro-ondas^{17,19}. Contudo, o seu princípio de funcionamento não é compatível com a magneto-hipertermia, como já discutido anteriormente, uma vez que o forte campo magnético estático do equipamento de ressonância magnética (1,5–7,0 T) impede que as nanopartículas magnéticas dissipem calor por perda histerética⁴⁸.

Assim, para aplicações envolvendo magneto-hipertermia, uma alternativa para a termografia *in vivo* e em tempo real poderia ser a técnica de imagiamento termográfico ultrassônico. Trata-se de uma técnica não invasiva, que não utiliza radiação ionizante, bem mais barata que o imagiamento por ressonância magnética e com a possibilidade de utilização de um *hardware* portátil. Resultados interessantes da literatura têm mostrado que essa modalidade pode vir a ser muito útil para a estimativa *in vivo* de temperaturas intratumorais na faixa de hipertermia, assim como para a correta delimitação das zonas de

ablação^{11(cap13),53}. Outra modalidade de termometria não invasiva possível de ser utilizada para monitorar em tempo real um procedimento de magneto-hipertermia, aplicável somente a tumores superficiais, mas com potencial impacto clínico significativo em termos de precisão, facilidade de utilização e relação custo-benefício, é o imageamento bidimensional por infravermelho^{47,66}, uma técnica que já tem sido utilizada na detecção precoce de tumores de mama⁶⁷ e de melanoma⁶⁸, evitando biópsias desnecessárias. No entanto, essa técnica mede a temperatura na superfície e demanda o desenvolvimento de complexas análises numéricas, resolvendo em tempo real a equação de biocalor, de forma compatível com as medidas de temperatura superficial por câmara térmica (de maneira quase sincronizada), para aferir a entrega de dose térmica na região intratumoral. Fica claro, portanto, que a determinação da dose térmica de forma não invasiva, em tempo real, durante a magneto-hipertermia, é um dos grandes desafios para o sucesso clínico dessa terapia inovadora.

5. Desafios, perspectivas e aplicações

É interessante notar que os problemas identificados por Gilchrist *et al.* já elencavam alguns dos principais desafios para uma implementação definitiva do procedimento de magneto-hipertermia na clínica médica³, como o monitoramento da temperatura e o desenvolvimento de equipamentos para uso clínico. Nesse último caso, o equipamento da MagForce é um grande avanço, mas ainda não permite o controle da escolha de qualquer volume de interesse dentro do paciente.

Em primeiro lugar, há um desafio relacionado à entrega ou ao *delivery* sistêmico das nanopartículas. Os resultados clínicos já publicados com aplicações da técnica de magneto-hipertermia no tratamento de glioblastomas⁶¹ e de carcinomas de próstata⁵⁸⁻⁶⁰ reportam a realização de injeções intratumorais de fluidos magnéticos contendo nanopartículas com diâmetros de, aproximadamente, 20 nm. A injeção intratumoral das nanopartículas depende do grau de dificuldade de acesso

ao tumor no corpo do paciente, sendo obviamente mais fácil de ser realizada em tumores subcutâneos⁶⁶. Em tumores mais profundos, a injeção intratumoral pode ser guiada por ultrassom⁵⁹ ou por tomografia computadorizada via fluoroscopia de raios X⁶⁹.

O tamanho da nanoestrutura é um parâmetro fundamental quando se busca um *delivery* sistêmico. Estudos demonstram que a rota de eliminação renal acontece para nanopartículas menores do que 6 nm, enquanto que, para partículas maiores, o processo de eliminação ocorre pela rota hepática⁷⁰. Além disso, sabe-se que a maioria dos tumores sólidos apresenta angiogênese extensa, caracterizada por arquitetura vascular e drenagem linfática defeituosas, fatores que permitem que partículas (com tamanhos tão grandes quanto 150 nm) se acumulem e sejam retidas dentro dos tumores por períodos mais longos do que nos tecidos normais. Esse fenômeno é conhecido como efeito de permeabilidade e retenção aumentadas (efeito EPR, do inglês *Enhanced Permeability and Retention effect*). Trata-se de um mecanismo de *vetorização passiva* de nanocarreadores, observado por Maeda, em 1986^{71,72}, mas atualmente amplamente contestado, por ser eficiente em murinos (estudos pré-clínicos), mas aparentemente não em humanos (estudos clínicos)⁷³. Paralelamente, nas últimas três décadas, foram inúmeras as propostas de nanocarreadores multifuncionais (numa variada faixa de tamanhos, de 1–1.000 nm), baseados essencialmente na adsorção de biomoléculas (tais como ácido fólico, anticorpos, fragmentos de anticorpos, receptores moleculares etc.) à superfície das nanopartículas, com o objetivo de aumentar a captação desses nanocarreadores por células-alvo. Trata-se de um mecanismo de *vetorização ativa*, que tem por objetivo a marcação, o imageamento e a entrega controlada de fármacos em nível celular^{1,55,74}.

Desde o trabalho pioneiro de Paul Ehrlich, o qual sugeriu o conceito da *bala mágica*⁷⁵, vem-se buscando uma eficiência de entrega de agentes terapêuticos em quantidade suficiente para o tratamento adequado de neoplasias malignas. Entretanto, avaliando 232 trabalhos publicados entre 2005 e 2015, Wilhelm *et al.* encontraram uma eficiência de

entrega cuja mediana é de apenas 0,7% da dose inicial. Nesse *review* controverso, foram avaliadas 175 estratégias de vetorização passiva e 56 de vetorização ativa visando a tumores sólidos⁷⁶. Assim, até o momento, não foi possível, por via sistêmica, viabilizar a hipertermia magnética de forma terapêutica, uma vez que o aquecimento macroscópico é um efeito coletivo e necessita de uma quantidade mínima de centros de calor para ocorrer^{77,78}. Além disso, supondo que a concentração intratumoral de nanopartículas entregues via rota sistêmica pudesse ser aumentada significativamente, há relatos na literatura indicando que, após o processo endocitótico dessas nanoestruturas, ocorrem processos de agregação que levam a uma maior interação dipolar magnética entre nanopartículas e, conseqüentemente, a uma diminuição da eficiência magnetotérmica^{33,40}.

Em segundo lugar, há um desafio relacionado ao estabelecimento de um limiar seguro da amplitude e da frequência do campo magnético externo. A aplicação de um campo eletromagnético alternado em tecidos vivos induz a geração de correntes elétricas de Foucault (as chamadas *eddy currents*), levando ao aquecimento por efeito Joule (dissipação resistiva) e de maneira não específica de toda a região do corpo exposta ao campo. Essa dissipação por *eddy currents* pode ser útil, por exemplo, na ablação de tumores sólidos por radiofrequência, configuração na qual o campo elétrico oscilante (na faixa de 450–500 kHz) acelera, na forma de corrente elétrica, íons K^+ , Na^+ e Cl^- do tecido tumoral em contato com os eletrodos metálicos^{23(p159)}. Contudo, durante a magneto-hipertermia, a potência dissipada de forma não localizada por *eddy currents* pode provocar o aquecimento não específico de tecidos saudáveis, uma vez que os tecidos saudáveis também possuem íons intra e extracelulares. Adicionalmente, na maioria dos resultados pré-clínicos e clínicos da literatura, é adotado um limiar para o produto (amplitude de campo \times frequência, Hf) igual a $4,85 \times 10^8 \text{ A}/(\text{m}\cdot\text{s})^1$, acima do qual podem haver prejuízos para a saúde do paciente. Assim, o *design* das nanopartículas deve, sim, visar a uma condição de máxima eficiência térmica, mas sempre dentro do limiar estabelecido pelo critério de Atkinson^{27(p53)}.

Em terceiro lugar, há um desafio relacionado ao limiar de temperatura e tempo de aquecimento necessário para causar danos térmicos biológicos irreversíveis às células neoplásicas, isto é, o problema da dose térmica. As respostas para esse desafio dependem, essencialmente, do desafio correlato que consiste no monitoramento preciso e em tempo real da distribuição espacial da temperatura intratumoral^{43,63}. No caso de Gilchrist *et al.*, a opção alternativa ao uso de termopares metálicos (obviamente incompatíveis com o emprego de campos magnéticos alternados) era o uso de termômetros de coluna de álcool – estes últimos sendo inviáveis para testes *in vivo*¹³.

Atualmente, prevalece a utilização de cateteres (termômetros de fibra-óptica com diâmetros de aproximadamente 0,5 mm–1,5 mm) na região tratada. Tipicamente, são inseridas de 1–5 sondas dentro do tumor, uma vez que o próprio tamanho do tumor pode ser um fator limitador para a inserção de muitas fibras ópticas. Esses termômetros, apesar de minimamente invasivos, fornecem o valor correto da temperatura em apenas poucos pontos dentro do tumor, subestimando assim a entrega tridimensional e não homogênea de calor, seja pela não homogeneidade da distribuição das nanopartículas ao longo do tumor, seja pelo arrefecimento promovido pela perfusão sanguínea tumoral.

Como a utilização da técnica de imageamento termográfico por ressonância magnética (considerando o *hardware* atual) é incompatível com a realização simultânea da magneto-hipertermia (pelo fato de o forte campo DC do equipamento de ressonância magnética bloquear o momento de dipolo magnético das nanopartículas, inviabilizando a geração de energia térmica via dissipação histerética dinâmica pelo mecanismo de relaxação de Néel-Brown), a termometria tridimensional em tempo real nessa modalidade de terapia térmica permanece, ainda, como uma questão em aberto⁴⁸. Até o momento, os melhores resultados clínicos de determinação volumétrica da temperatura do tumor sob hipertermia magnética são obtidos calculando esses valores de temperatura ponto a ponto no espaço: identificando o volume ocupado pelas nanopartículas no tumor, por exemplo, por tomografia compu-

tadorizada; e, em seguida, resolvendo numericamente a equação de biocalor de Pennes, utilizando como parâmetro de ajuste um valor médio da taxa de perfusão sanguínea e da eficiência magnetotérmica *in vivo* – esses parâmetros, por sua vez, são determinados combinando as temperaturas calculadas via medições diretas (termômetros de fibra óptica) em pontos de referência dentro ou perto da região-alvo^{60,61,69}.

Em resumo, os desafios elencados foram: (i) monitoramento em tempo real da dose térmica; (ii) síntese de nanoestruturas que respondam, em condições biológicas, a campos magnéticos dentro do critério de Atkinson; (iii) capacidade de entrega seletiva de nanocarreadores magnéticos, em quantidade terapêutica, via *delivery* sistêmico. Apesar dessas questões, é possível que uma nova tecnologia em desenvolvimento, denominada MPI (*Magnetic Particle Imaging*^{79–82}), atualmente aplicada apenas em estudos pré-clínicos, possa resolver muitos desses problemas. Com o MPI, é possível selecionar regiões de interesse dentro do corpo (ROIs) de forma a excitar as nanopartículas magnéticas apenas numa área específica. Tal propriedade é resultado da combinação de campos DC, formando gradientes de campo magnético e regiões sem campo, com campo magnético AC, que possui a função de excitar os traçadores magnéticos apenas nas ROIs.

Em 2017, Hensley *et al.* combinaram a técnica diagnóstica de MPI com a hipertermia magnética⁸³. Nesse primeiro trabalho, esse grupo de Berkeley mostrou o desenvolvimento do equipamento de MPI-HM. Mais recentemente, em 2018, o mesmo grupo apresentou resultados *in vivo* demonstrando a capacidade de aquecer ROIs específicas dentro do corpo do animal⁸⁴. Esse resultado é muito importante, pois um dos limitantes nas aplicações pré-clínicas por *delivery* sistêmico estava relacionado a procedimentos em que o animal era colocado completamente dentro de bobinas. Nesse caso, como a maior parte das nanopartículas acabam indo para o fígado e não para o tumor, o aquecimento não específico em regiões distintas da área de interesse levava à morte dos camundongos durante o procedimento de magneto-hipertermia (em alguns casos devido a um forte aumento da temperatura do sangue,

como resultado do aquecimento por convecção). Tal efeito pode ser minimizado, mas não solucionado, usando bobinas com campo não uniforme⁴⁷. O MPI permite selecionar ROIs específicas no paciente, evitando esse grave problema. Em Tay *et al.* a localização das nanopartículas magnéticas foi feita usando a técnica de MPI, com excitação numa frequência de 20 kHz, enquanto que a hipertermia magnética foi realizada em 354 kHz numa amplitude de campo de 13 mT (130 Oe)⁸⁴. Esse resultado é muito animador, mas note-se que esse campo ainda está acima do limite biológico para humanos. Portanto, a síntese de novos nanomateriais, que respondam em baixa amplitude de campo, ainda é um desafio. Além disso, a possibilidade de implementar essa técnica para seres humanos ainda precisa ser demonstrada.

Independentemente das questões levantadas acima, há várias importantes e interessantes aplicações usando a magneto-hipertermia sendo demonstradas na literatura. Em particular, destacamos aquelas associadas à liberação controlada de agentes terapêuticos mediada por entrega de calor. Por exemplo, Hoare *et al.* desenvolveram uma membrana magnética que consiste em um nanogel, nanopartículas de magnetita e um reservatório de fármacos que permite a liberação das moléculas de interesse por meio do controle do pulso de campo magnético, o qual, ao interagir com as nanopartículas magnéticas, gera calor por hipertermia magnética. Isso afeta as propriedades físicas do nanogel, que, quando a temperatura aumenta, permite o fluxo do agente terapêutico para o paciente⁸⁵. Brazel revisou diversas aplicações utilizando nanomateriais magnetotermossensíveis que combinam nanopartículas magnéticas e polímeros termossensíveis para a liberação controlada de fármacos por calor⁸⁶. Quinto *et al.* desenvolveram um nanocarreador magnético consistindo de nanopartículas magnéticas, fosfolipídios *PEGuilados* e doxorubicina que, sob hipertermia magnética, permite a ação combinada de quimioterapia e hipertermia via liberação da doxorubicina após a magneto-hipertermia⁸⁷. O Grupo de Nanomagnetismo da UFG, recentemente, publicou uma estratégia semelhante, ao desenvolver nanopartículas magnéticas lipídicas sólidas contendo fosfatidilcolina, o polímero termossensível pluronic F-68

e nanopartículas magnéticas de magnetita, além do quimioterápico paclitaxel. Neste artigo, demonstramos o aumento da taxa de liberação do paclitaxel após a hipertermia magnética⁸⁸. Diversos artigos semelhantes têm aparecido na literatura, mas, obviamente, há várias outras aplicações além do campo da oncologia.

Em 2010, Huang *et al.* demonstraram como controlar a entrada de íons em canais iônicos, que são temperatura-dependentes, por meio de magneto-hipertermia. As células investigadas foram geneticamente modificadas para expressar a proteína AP-CFP-TM, em que AP se refere a um peptídeo que é capaz de se acoplar com a biotina. Nanopartículas de ferrita de manganês foram conjugadas com streptavidina. Esse recobrimento molecular das nanopartículas magnéticas permitiu-lhes seletividade para proteínas de membrana, em particular para os canais de TRPV1. Neste trabalho, as nanopartículas foram submetidas à radiofrequência de 40 MHz e campo de 8,4 Oe. A ativação dos canais iônicos foi demonstrada, inclusive, em uma espécie animal (*C. elegans*). Importantes aplicações em neurologia foram ressaltadas, sugerindo que a hipertermia magnética poderia ser usada no futuro para ativação de neurônios. Outro exemplo consiste na utilização da nanomedicina térmica para o controle de agentes infecciosos. Estudos recentes têm demonstrado que infecções bacterianas, diferentemente de células tumorais, resistem a temperaturas muito mais altas. Em particular, somente em temperaturas ablativas (da ordem de 80°C) é possível matar a maioria das bactérias⁸⁹⁻⁹¹. Recentemente, Ibelli *et al.* escreveram um artigo de revisão discutindo os grandes desafios de se usarem técnicas de hipertermia para o tratamento de infecções. Em geral, serão necessárias altas temperaturas para um controle dessas infecções, inclusive no importante controle de biofilmes em dispositivos médicos, como cateteres, que são uma das causas de mortes hospitalares por infecções. Para essa aplicação, a hipertermia fototérmica parece ser bastante eficaz^{89,91}. A hipertermia magnética também pode ser usada, gerando temperaturas menores, para a liberação controlada de agentes antibacterianos. É apenas uma questão de tempo para que várias aplicações semelhantes, baseadas no controle de liberação de

agentes terapêuticos por calor, por exemplo, via a hipertermia magnética, sejam desenvolvidas e aplicadas para a melhora da qualidade de vida e para o tratamento mais eficiente de diversas doenças, inclusive o câncer, já que tal controle pode evitar diversos efeitos colaterais de quimioterápicos.

Finalmente, há uma possível importante aplicação da hipertermia magnética em imunoterapia. Como relatado anteriormente, em 2006, Kobayashi *et al.*⁵¹ investigaram o efeito da magneto-hipertermia usando magnetolipossomas. O grupo relatou, no modelo tumoral T-9 (glioma), um efeito abscopal como resultado da magneto-hipertermia. Nesse caso, os pesquisadores induziram 2 tumores, em posições diametralmente opostas no abdômen do camundongo, e trataram apenas um deles, após a injeção intratumoral dos nanocarreadores. Os autores indicaram que a temperatura do tumor atingiu em torno de 46°C durante a hipertermia magnética. Após 28 dias, observaram, em um animal, que os dois tumores tiveram remissão completa. Até o presente momento, uma investigação mais detalhada ainda não foi apresentada por esse grupo. No entanto, a possibilidade do uso da hipertermia para tratamento de metástases tem sido o foco de trabalhos recentes na perspectiva de uma futura aplicação da hipertermia magnética como uma “vacina” no combate ao câncer^{52–54}. Em particular, Toraya-Brown *et al.* mostraram a ativação de células CD8⁺ após hipertermia magnética, com os tumores tendo sido mantidos a uma temperatura de 43°C³⁵. No mesmo experimento, mantendo o tumor a 45°C, de acordo com os autores, não houve resposta imunológica induzida. Esse valor está aparentemente em discordância com o resultado de Kobayashi *et al.* e sugere que novas investigações ainda são necessárias para tentar compreender melhor como ampliar e melhorar a resposta imunológica por meio da magneto-hipertermia. Esta certamente é uma nova área de pesquisa, de grande interesse científico e com grande possibilidade de impacto clínico.

Em resumo, a magneto-hipertermia é uma técnica inovadora, com grande potencial para o tratamento do câncer. Há, no entanto, diversos desafios a serem vencidos para que a técnica seja ainda mais utilizada na clínica. Apesar disso, o futuro é promissor, já que novas tecnologias e novos nanomateriais podem solucionar boa parte dos desafios da área nos próximos anos. Adicionalmente, o controle da entrega seletiva de calor pode ser usado para o desenvolvimento de novos protocolos clínicos, os quais podem diminuir consideravelmente efeitos colaterais de técnicas tradicionais, como a quimioterapia. Há ainda grande potencial em imunoterapia, visando desde o desenvolvimento de vacinas até a liberação de drogas imunoterápicas de forma controlada e localizada por meio do calor. Finalmente, como, em princípio, é possível aplicar o campo magnético em qualquer região dentro do corpo do paciente, essa técnica tem a capacidade de gerar calor de forma muito controlada e, mais importante ainda, de maneira não invasiva. Tais propriedades sugerem que a hipertermia magnética poderá auxiliar, e muito, o tratamento do câncer, além de contribuir para uma melhoria da qualidade de vida de pacientes por meio do desenvolvimento de terapias mais eficientes. Há ainda várias outras áreas que deverão se beneficiar da magneto-hipertermia, e, portanto, muito espaço para novos avanços científicos e tecnológicos.

Referências

1. KOZISSNIK, Bettina et al. Magnetic fluid hyperthermia: Advances, challenges, and opportunity. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p.706-714, 9 out. 2013.
2. IVKOV, Robert. Magnetic nanoparticle hyperthermia: A new frontier in biology and medicine? **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p.703-705, 12 nov. 2013.
3. DENNIS, Cindi L.; IVKOV, Robert. Physics of heat generation using magnetic nanoparticles for hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p.715-729, 16 out. 2013.
4. BROWN, William Fuller. Thermal Fluctuations of a Single-Domain Particle. **Physical Review**, v. 130, n. 5, p.1677-1686, 1 jun. 1963.
5. BROWN, William. Thermal fluctuation of fine ferromagnetic particles. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 15, n. 5, p.1196-1208, set. 1979.
6. NÉEL, Louis. Théorie du traînage magnétique des substances massives dans le domaine de Rayleigh. **Journal de Physique et le Radium**, v. 11, n. 2, p.49-61, 1950.
7. FRENKEL, Yakovich. **Kinetic Theory of Liquids**. New York: Dover, 1955.
8. ROSENSWEIG, Ronald E. Magnetic Fluids. **Annual Review of Fluid Mechanics**, v. 19, n. 1, p.437-461, jan. 1987.
9. VERDE, Ediron Lima et al. Field dependent transition to the non-linear regime in magnetic hyperthermia experiments: Comparison between maghemite, copper, zinc, nickel and cobalt ferrite nanoparticles of similar sizes. **AIP Advances**, v. 2, n. 3, p.032120-1–23, set. 2012.

10. VERDE, Ediron Lima et al. Magnetic hyperthermia investigation of cobalt ferrite nanoparticles: Comparison between experiment, linear response theory, and dynamic hysteresis simulations. **Journal of Applied Physics**, v. 111, n. 12, p.123902-1–8, 15 jun. 2012.
11. LANDI, Gabriel T. Role of dipolar interaction in magnetic hyperthermia. **Physical Review B**, v. 89, n. 1, p.014403-1–6, 6 jan. 2014.
12. CARREY, J.; MEHDAOUI, B.; RESPAUD, M. Simple models for dynamic hysteresis loop calculations of magnetic single-domain nanoparticles: Application to magnetic hyperthermia optimization. **Journal of Applied Physics**, v. 109, n. 8, p.083921-1–17, 15 abr. 2011.
13. GILCHRIST, R. K. et al. Selective Inductive Heating of Lymph Nodes. **Annals of Surgery**, v. 146, n. 4, p.596-606, out. 1957.
14. LEPETIT-COIFFÉ, Matthieu et al. Real-time monitoring of radiofrequency ablation of liver tumors using thermal-dose calculation by MR temperature imaging: initial results in nine patients, including follow-up. **European Radiology**, v. 20, n. 1, p.193-201, 6 ago. 2009.
15. ABLATION Therapy. Disponível em: <<https://www.mdanderson.org/treatment-options/ablation-therapy.html>>. Acesso em: 26 ago. 2018.
16. LAESEKE, Paul F. et al. Multiple-Electrode Radiofrequency Ablation of Hepatic Malignancies: Initial Clinical Experience. **American Journal of Roentgenology**, v. 188, n. 6, p.1485-1494, jun. 2007.
17. RHIM, H. Review of Asian experience of thermal ablation techniques and clinical practice. **International Journal of Hyperthermia**, v. 20, n. 7, p.699-712, nov. 2004.
18. CHEN, Min-Hua et al. Large Liver Tumors: Protocol for Radiofrequency Ablation and Its Clinical Application in 110 Patients – Mathematical Model, Overlapping Mode, and Electrode Placement Process. **Radiology**, v. 232, n. 1, p.260-271, jul. 2004.
19. RYAN, Thomas P.; TURNER, Paul F.; HAMILTON, Brianne. Interstitial microwave transition from hyperthermia to ablation: Historical perspectives and current trends in thermal therapy. **International Journal of Hyperthermia**, v. 26, n. 5, p.415-433, 2 jul. 2010.

20. MALONEY, Ezekiel; HWANG, Joo Ha. Emerging HIFU applications in cancer therapy. **International Journal of Hyperthermia**, v. 31, n. 3, p.302-309, 4 nov. 2014.
21. BSD-2000 3D/MR Microwave Hyperthermia System. Disponível em: <<https://www.pyrexar.com/hyperthermia/bsd-2000-3d-mr>>. Acesso em: 26 ago. 2018.
22. BERTOTTI, Giorgio. **Hysteresis in Magnetism: For Physicists, Materials Scientists, and Engineers**. San Diego: Academic Press, 1998.
23. MOROS, Eduardo G. (Ed.). **Physics of Thermal Therapy: Fundamentals and Clinical Applications**. Boca Raton: CRC Press, 2013.
24. ATKINSON, William J.; BREZOVICH, Ivan A.; CHAKRABORTY, Dev P. Usable Frequencies in Hyperthermia with Thermal Seeds. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 1, p.70-75, jan. 1984.
25. ETHERIDGE, M. L.; BISCHOF, J. C. Optimizing Magnetic Nanoparticle Based Thermal Therapies Within the Physical Limits of Heating. **Annals of Biomedical Engineering**, v. 41, n. 1, p.78-88, 2 ago. 2012.
26. OLESON, James R. A Review of Magnetic Induction Methods for Hyperthermia Treatment of Cancer. **IEEE Transactions on Biomedical Engineering**, v. 31, n. 1, p.91-97, jan. 1984.
27. CARRIÃO, Marcus. **Magnetohipertermia em nanopartículas core-shell**. 2016. 125 f. Tese (Doutorado) – Curso de Pós-Graduação em Física, Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2016.
28. MAGFORCE. Disponível em: <<https://www.magforce.com/en/home/>>. Acesso em: 01 fev. 2019.
29. DEBYE, Paul. **Polar molecules**. New York: Dover, 1945.
30. ROSENSWEIG, Ronald E. Heating magnetic fluid with alternating magnetic field. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 252, p.370-374, nov. 2002.

31. HERGT, R. et al. Physical limits of hyperthermia using magnetite fine particles. **IEEE Transactions on Magnetics**, v. 34, n. 5, p.3745-3754, 1998.
32. RUTA, S.; CHANTRELL, R.; HOVORKA, O. Unified model of hyperthermia via hysteresis heating in systems of interacting magnetic nanoparticles. **Scientific Reports**, v. 5, n. 1, p.1-7, 13 mar. 2015.
33. BRANQUINHO, Luis C. et al. Effect of magnetic dipolar interactions on nanoparticle heating efficiency: Implications for cancer hyperthermia. **Scientific Reports**, v. 3, n. 1, p.1-10, 7 out. 2013.
34. CABRERA, David et al. Dynamical Magnetic Response of Iron Oxide Nanoparticles Inside Live Cells. **ACS Nano**, v. 12, n. 3, p.2741-2752, 6 mar. 2018.
35. CARRIÃO, Marcus S.; BAKUZIS, Andris F. Mean-field and linear regime approach to magnetic hyperthermia of core-shell nanoparticles: can tiny nanostructures fight cancer? **Nanoscale**, v. 8, n. 15, p.8363-8377, 2016.
36. CARRIÃO, M. S. et al. Giant-spin nonlinear response theory of magnetic nanoparticle hyperthermia: A field dependence study. **Journal of Applied Physics**, v. 121, n. 17, p.173901-1-13, 7 mai. 2017.
37. NÉEL, Louis. Théorie du traînage magnétique des substances massives dans le domaine de Rayleigh. **Journal de Physique et le Radium**, v. 11, n. 2, p.49-61, 1950.
38. COFFEY, William T.; KALMYKOV, Yuri P. Thermal fluctuations of magnetic nanoparticles: Fifty years after Brown. **Journal of Applied Physics**, v. 112, n. 12, p.121301.1-47, 15 dez. 2012.
39. JEON, Seongho et al. Quantifying intra- and extracellular aggregation of iron oxide nanoparticles and its influence on specific absorption rate. **Nanoscale**, v. 8, n. 35, p.16053-16064, 2016.
40. DI CORATO, Riccardo et al. Magnetic hyperthermia efficiency in the cellular environment for different nanoparticle designs. **Biomaterials**, v. 35, n. 24, p.6400-6411, ago. 2014.

41. LEE, Jae-Hyun et al. Exchange-coupled magnetic nanoparticles for efficient heat induction. **Nature Nanotechnology**, v. 6, n. 7, p.418-422, 26 jun. 2011.
42. BRANQUINHO, Luis Cesar. **Efeito da interação dipolar magnética na eficiência de aquecimento de nanopartículas**: Implicações para magneto-hipertermia. 2014. 155 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-Graduação em Física, Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.
43. VAN RHOON, Gerard C. Is CEM43 still a relevant thermal dose parameter for hyperthermia treatment monitoring? **International Journal of Hyperthermia**, v. 32, n. 1, p.50-62, 2 jan. 2016.
44. INCROPERA, Frank P. et al. **Fundamentals of Heat and Mass Transfer**. Hoboken: John Wiley & Sons, 2007.
45. PENNES, Harry H. Analysis of Tissue and Arterial Blood Temperatures in the Resting Human Forearm. **Journal of Applied Physiology**, v. 1, n. 2, p.93-1122, ago. 1948.
46. WISSLER, Eugene H. Pennes' 1948 paper revisited. **Journal of Applied Physiology**, v. 85, n. 1, p.35-41, jul. 1998.
47. RODRIGUES, Harley F. et al. Precise determination of the heat delivery during in vivo magnetic nanoparticle hyperthermia with infrared thermography. **Physics in Medicine and Biology**, v. 62, n. 10, p.4062-4082, 20 abr. 2017.
48. MEHDAOUI, B. et al. Influence of a transverse static magnetic field on the magnetic hyperthermia properties and high-frequency hysteresis loops of ferromagnetic FeCo nanoparticles. **Applied Physics Letters**, v. 100, n. 5, p.052403.1-3, 30 jan. 2012.
49. JORDAN, Andreas et al. Magnetic fluid hyperthermia (MFH): Cancer treatment with AC magnetic field induced excitation of biocompatible superparamagnetic nanoparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**, v. 201, n. 1-3, p.413-419, jul. 1999.
50. HILGER, Ingrid et al. Electromagnetic Heating of Breast Tumors in Interventional Radiology: In Vitro and in Vivo Studies in Human Cadavers and Mice. **Radiology**, v. 218, n. 2, p.570-575, fev. 2001.

51. ITO, Akira; HONDA, Hiroyuki; KOBAYASHI, Takeshi. Cancer immunotherapy based on intracellular hyperthermia using magnetite nanoparticles: a novel concept of “heat-controlled necrosis” with heat shock protein expression. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 55, n. 3, p.320-328, 25 ago. 2005.
52. TORAYA-BROWN, Seiko et al. Local hyperthermia treatment of tumors induces CD8+ T cell-mediated resistance against distal and secondary tumors. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 10, n. 6, p.1273-1285, ago. 2014.
53. KOBAYASHI, Takeshi et al. Antitumor immunity by magnetic nanoparticle-mediated hyperthermia. **Nanomedicine**, v. 9, n. 11, p.1715-1726, ago. 2014.
54. TORAYA-BROWN, Seiko; FIERING, Steven. Local tumour hyperthermia as immunotherapy for metastatic cancer. **International Journal of Hyperthermia**, v. 30, n. 8, p.531-539, 28 nov. 2014.
55. DENNIS, C. L. et al. Nearly complete regression of tumors via collective behavior of magnetic nanoparticles in hyperthermia. **Nanotechnology**, v. 20, n. 39, p.395103-1–7, 3 set. 2009.
56. CANDIDO, N. M. et al. High Efficacy in Hyperthermia-associated with Polyphosphate Magnetic Nanoparticles for Oral Cancer Treatment. **Journal of Nanomedicine & Nanotechnology**, v. 05, n. 03, p.1-11, 2014.
57. RODRIGUES, Harley Fernandes. **Hipertermia magnética in vivo com nanopartículas de $MnFe_2O_4$ no tratamento de tumores sólidos e subcutâneos de Sarcoma 180**. 2017. 279 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Física, Instituto de Física, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2017.
58. JOHANNSEN, Manfred et al. Morbidity and quality of life during thermotherapy using magnetic nanoparticles in locally recurrent prostate cancer: Results of a prospective phase I trial. **International Journal of Hyperthermia**, v. 23, n. 3, p.315-323, jan. 2007.

59. JOHANNSEN, Manfred et al. Thermotherapy of Prostate Cancer Using Magnetic Nanoparticles: Feasibility, Imaging, and Three-Dimensional Temperature Distribution. **European Urology**, v. 52, n. 6, p.1653-1662, dez. 2007.
60. JOHANNSEN, Manfred et al. Magnetic nanoparticle hyperthermia for prostate cancer. **International Journal of Hyperthermia**, v. 26, n. 8, p.790-795, 23 jul. 2010.
61. MAIER-HAUFF, Klaus et al. Efficacy and safety of intratumoral thermotherapy using magnetic iron-oxide nanoparticles combined with external beam radiotherapy on patients with recurrent glioblastoma multiforme. **Journal of Neuro-oncology**, v. 103, n. 2, p.317-324, 16 set. 2010.
62. YARMOLENKO, Pavel S. et al. Thresholds for thermal damage to normal tissues: An update. **International Journal of Hyperthermia**, v. 27, n. 4, p.320-343, 18 mai. 2011.
63. DEWHIRST, Mark Wesley et al. Basic principles of thermal dosimetry and thermal thresholds for tissue damage from hyperthermia. **International Journal of Hyperthermia**, v. 19, n. 3, p.267-294, jan. 2003.
64. BITTON, Rachel R. et al. Improving thermal dose accuracy in magnetic resonance-guided focused ultrasound surgery: Long-term thermometry using a prior baseline as a reference. **Journal of Magnetic Resonance Imaging**, v. 43, n. 1, p.181-189, 26 jun. 2015.
65. ARTHUR, R. Martin et al. Developing ultrasonic temperature imaging to aid cancer treatment. **Spie Newsroom**, p.1-3, 2007.
66. RODRIGUES, Harley F. et al. Real-time infrared thermography detection of magnetic nanoparticle hyperthermia in a murine model under a non-uniform field configuration. **International Journal of Hyperthermia**, v. 29, n. 8, p.752-767, 18 out. 2013.
67. NG, E. Y.-K. A review of thermography as promising non-invasive detection modality for breast tumor. **International Journal of Thermal Sciences**, v. 48, n. 5, p.849-859, mai. 2009.

68. HERMAN, Cila. The role of dynamic infrared imaging in melanoma diagnosis. **Expert Review of Dermatology**, v. 8, n. 2, p.177-184, abr. 2013.
69. WUST, Peter et al. Magnetic nanoparticles for interstitial thermo-therapy – feasibility, tolerance and achieved temperatures. **International Journal of Hyperthermia**, v. 22, n. 8, p.673-685, jan. 2006.
70. WEISSLEDER, Ralph; NAHRENDORF, Matthias; PITTET, Mikael J. Imaging macrophages with nanoparticles. **Nature Materials**, v. 13, n. 2, p.125-138, fev. 2014.
71. MAEDA, Hiroshi. Tumor-Selective Delivery of Macromolecular Drugs via the EPR Effect: Background and Future Prospects. **Bio-conjugate Chemistry**, v. 21, n. 5, p.797-802, 19 mai. 2010.
72. MAEDA, Hiroshi et al. Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. **Journal of Controlled Release**, v. 65, n. 1-2, p.271-284, mar. 2000.
73. DANHIER, Fabienne. To exploit the tumor microenvironment: Since the EPR effect fails in the clinic, what is the future of nanomedicine? **Journal of Controlled Release**, v. 244, p.108-121, dez. 2016.
74. PETROS, Robby A.; DESIMONE, Joseph M. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 9, n. 8, p.615-627, 9 jul. 2010.
75. STREBHARDT, Klaus; ULLRICH, Axel. Paul Ehrlich's magic bullet concept: 100 years of progress. **Nature Reviews Cancer**, v. 8, n. 6, p.473-480, 12 mai. 2008.
76. WILHELM, Stefan et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. **Nature Reviews Materials**, v. 1, n. 5, p.1-12, 26 abr. 2016.
77. GRATTON, S. E. A. et al. The effect of particle design on cellular internalization pathways. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 105, n. 33, p.11613-11618, 12 ago. 2008.

78. RABIN, Y. Is intracellular hyperthermia superior to extracellular hyperthermia in the thermal sense? **International Journal of Hyperthermia**, v. 18, n. 3, p.194-202, jan. 2002.
79. GLEICH, Bernhard; WEIZENECKER, Jürgen. Tomographic imaging using the nonlinear response of magnetic particles. **Nature**, v. 435, n. 7046, p.1214-1217, jun. 2005.
80. GLEICH, B; WEIZENECKER, J; BORGERT, J. Experimental results on fast 2D-encoded magnetic particle imaging. **Physics in Medicine and Biology**, v. 53, n. 6, p.81-84, 22 fev. 2008.
81. GOODWILL, Patrick William et al. X-Space MPI: Magnetic Nanoparticles for Safe Medical Imaging. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p.3870-3877, 19 mar. 2012.
82. PABLICO-LANSIGAN, Michele H.; SITU, Shu F.; SAMIA, Anna Cristina S. Magnetic particle imaging: advancements and perspectives for real-time in vivo monitoring and image-guided therapy. **Nanoscale**, v. 5, n. 10, p.4040-4055, 2013.
83. HENSLEY, Daniel et al. Combining magnetic particle imaging and magnetic fluid hyperthermia in a theranostic platform. **Physics in Medicine and Biology**, v. 62, n. 9, p.3483-3500, 5 abr. 2017.
84. TAY, Zhi Wei et al. Magnetic Particle Imaging-Guided Heating in Vivo Using Gradient Fields for Arbitrary Localization of Magnetic Hyperthermia Therapy. **ACS Nano**, v. 12, n. 4, p.3699-3713, 23 mar. 2018.
85. HOARE, Todd et al. A Magnetically Triggered Composite Membrane for On-Demand Drug Delivery. **Nano Letters**, v. 9, n. 10, p.3651-3657, 14 out. 2009.
86. BRAZEL, Christopher S. Magnetothermally-responsive Nanomaterials: Combining Magnetic Nanostructures and Thermally-Sensitive Polymers for Triggered Drug Release. **Pharmaceutical Research**, v. 26, n. 3, p.644-656, 13 nov. 2008.

87. QUINTO, Christopher A. et al. Multifunctional superparamagnetic iron oxide nanoparticles for combined chemotherapy and hyperthermia cancer treatment. **Nanoscale**, v. 7, n. 29, p.12728-12736, 2015.
88. OLIVEIRA, Relton Romeis et al. Triggered release of paclitaxel from magnetic solid lipid nanoparticles by magnetic hyperthermia. **Materials Science and Engineering: C**, v. 92, p.547-553, nov. 2018.
89. IBELLI, Taylor; TEMPLETON, Sarah; LEVI-POLYACHENKO, Nicole. Progress on utilizing hyperthermia for mitigating bacterial infections. **International Journal of Hyperthermia**, v. 34, n. 2, p.144-156, 17 fev. 2018.
90. CORTIE, Michael B.; CORTIE, David L.; TIMCHENKO, Victoria. Heat transfer from nanoparticles for targeted destruction of infectious organisms. **International Journal of Hyperthermia**, v. 34, n. 2, p.157-167, 17 fev. 2018.
91. RIBEIRO, Kalline L. et al. Clavanin A-bioconjugated Fe_3O_4 /Silane core-shell nanoparticles for thermal ablation of bacterial biofilms. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 169, p.72-81, set. 2018.

CAPÍTULO 8

Aplicações da nanotecnologia em tratamentos antivirais

Andréia C. Pinheiro¹; Beatriz C. A. O. Faria^{1,2}; Patrícia L. Costa^{1,2}; Marília F. Calmon³; Graziella A. Joanitti^{1,2,*}

1. Introdução

1.1 Estrutura de um vírus

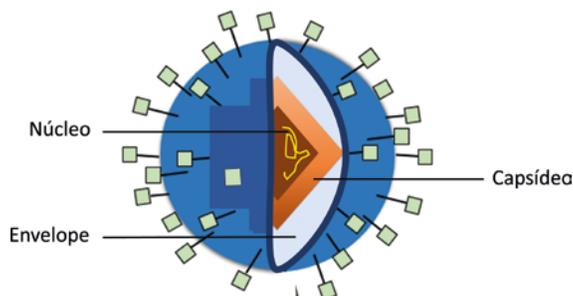
Os vírus estão na escala nanométrica e apresentam uma estrutura bastante simplificada, composta, basicamente, por um núcleo e um capsídeo. O conjunto desses dois componentes é denominado nucleocapsídeo. Há alguns vírus que apresentam, ainda, uma terceira estrutura, denominada envelope, a qual envolve o nucleocapsídeo (**Figura 1**). Além disso, os vírus possuem em sua estrutura proteínas que reconhecem e se ligam aos receptores de membrana das células hospedeiras, permitindo a penetração do seu material genético no meio intracelular¹.

1. Instituto de Biologia, Universidade de Brasília, Brasil

2. Faculdade de Ceilândia, Universidade de Brasília, Brasil

3. Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas-UNESP, São José do Rio Preto, Brasil

* E-mail: gjoanitti@unb.br

Figura 1. Estrutura geral de um vírus (*Hepatitis virus*)

Fonte: elaborada pelos autores.

O núcleo de um vírus pode ser composto por DNA de fita simples, DNA de fita dupla ou dupla parcial, ou pode ser composto por RNA (fita simples). A sequência de nucleotídeos presente no genoma do vírus apresenta o código para a fabricação das proteínas componentes do capsídeo e das proteínas necessárias para a reprodução do vírus².

O capsídeo do vírus é composto por proteínas, que podem ser diversificadas ou não, que, agregadas, formam uma cápsula protetora do núcleo. Há diversas formas de capsídeo, podendo ser cilíndrico, poliédrico, arredondados, ou até mesmo apresentar uma “cabeça” e uma “cauda”, como é o caso dos vírus bacteriófagos³. Tal característica é de extrema importância para a classificação dos vírus.

O envelope viral presente em alguns vírus é uma estrutura derivada de membranas de células parasitadas no momento em que o vírus maduro deixa a célula hospedeira. Entretanto, ela pode ser oriunda do aparelho de Golgi, retículo endoplasmático ou, até mesmo, da membrana nuclear, dependendo do local da célula onde ocorre a replicação, podendo variar de acordo com o vírus. Dessa forma, o envelope é composto de uma dupla camada lipídica com algumas glicoproteínas associadas (codificadas pelo vírus), que desempenham inúmeras funções, dentre elas o reconhecimento e a ancoragem nos receptores de membrana das células hospedeiras^{3,4}.

Diante dessa estrutura relativamente simples, composta basicamente por material genético envolto por uma cápsula de proteína, os vírus não possuem organelas e são ditos acelulares. Assim, para que consigam se replicar, obrigatoriamente necessitam estar dentro de uma célula viva — por isso, são denominados parasitas intracelulares obrigatórios¹.

1.2 Hospedeiros dos vírus

Os vírus infectam qualquer organismo vivo — desde bactérias, protozoários e fungos até vegetais e animais. De um modo geral, os vírus causam doenças ao parasitarem células dos seres vivos, podendo levar à morte do indivíduo, diminuir sua qualidade de vida e até interferir em seu desenvolvimento¹. Nesse aspecto, vale ressaltar o impacto econômico quando viroses atacam rebanhos, plantações, aquários, uma vez que há um enorme número de mortes e de más-formações causadas pelas infecções de vírus.

Em se tratando de seres humanos, diversas doenças virais podem ser listadas, incluindo sarampo, gripe, resfriados, boubá aviária, caxumba, hepatite, poliomielite, herpes, raiva, AIDS, febres hemorrágicas fatais (como dengue hemorrágica e ebola), febre amarela, zika e febre chikungunya⁵. Algumas delas já estão sob controle, outras são novas e oferecem risco às populações. E há, ainda, as viroses emergentes⁶. A seguir, estão descritos mais detalhes de vírus que acometem seres humanos.

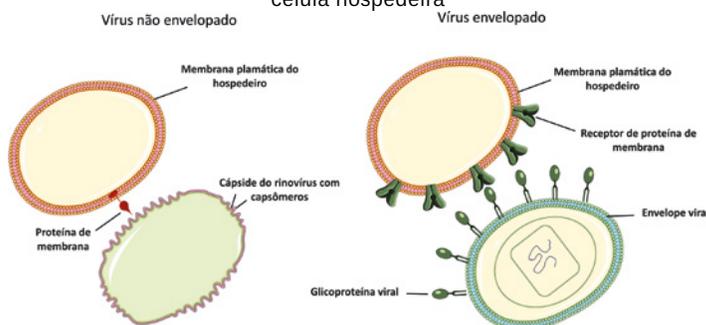
1.3 Modo de ação dos vírus

Devido ao fato de os vírus serem acelulares, eles necessitam utilizar a “maquinaria” de células hospedeiras para se replicarem. De um modo geral, as formas como eles agem são semelhantes, mesmo nos diversos tipos de vírus, e são subdivididas nas seguintes etapas^{1,3} (**Figuras 2 e 3**).

a) Adsorção

Para que o vírus penetre na célula hospedeira, primeiramente ele precisa reconhecê-la e se ligar a ela. Isso é possível devido à presença de receptores de membrana celular presentes nessas células, as quais se ligarão às proteínas presentes ou no envelope do vírus (geralmente glicoproteínas), ou em seu capsídeo, de modo que cada vírus tem sua célula-alvo, e não infecta qualquer célula (**Figura 2**). Dessa forma, se não houver essa ligação, não haverá infecção.

Figura 2. Interação entre vírus (não envelopado e envelopado) com célula hospedeira



Fonte: elaborada pelos autores.

b) Penetração

Após a ligação, o núcleo do vírus é introduzido para dentro da célula hospedeira. Em um vírus envelopado, ocorre a fusão da membrana viral com a da célula hospedeira, sendo liberado o material genético do vírus. Para o não envelopado, o nucleocapsídeo é internalizado por endocitose. Em ambos os casos, o nucleocapsídeo viral fica no citoplasma ou em vesículas endocíticas.

c) Desnudamento

O nucleocapsídeo é rompido (podendo necessitar da ação de enzimas) e o núcleo do vírus é liberado para o citoplasma ou para o núcleo da célula. Dessa forma, o genoma viral pode iniciar seu ciclo replicativo, para tal associando-se ao núcleo da célula ou replicando cópias por meio de organelas celulares.

d) Expressão gênica e replicação

O material genético do vírus é replicado utilizando a “maquinaria” celular.

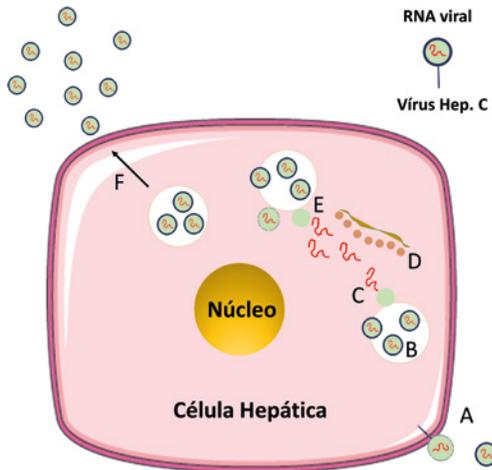
e) Maturação

Após replicado o material genético, ocorre a formação do capsídeo que vai envolvê-lo. Nos vírus envelopados, há adição de uma membrana celular com dupla camada lipídica provida da célula hospedeira, quando o capsídeo atravessa a membrana nuclear, ou aparelho de Golgi, ou o retículo endoplasmático, ou a membrana plasmática, quando está saindo da célula.

f) Liberação

Quando o vírus está pronto e maturado, ele abandona a célula hospedeira. Vírus sem envelope saem da célula por meio de lise celular; já os envelopados atravessam sua membrana, sem, necessariamente, matar a célula.

Figura 3. Ciclo de replicação viral do vírus Hepatite C com todas as etapas. (A) Absorção, (B) Penetração, (C) Desnudamento, (D) Expressão gênica e replicação, (E) Maturação, (F) Liberação



Fonte: elaborada pelos autores.

Todas as etapas do ciclo de replicação viral são mediadas por enzimas. Assim, a inibição de qualquer dessas enzimas pode atrapalhar e/ou impedir que a replicação viral ocorra¹.

1.4 Famílias de vírus de importância clínica

As doenças virais variam de infecções triviais a epidemias, endemias e pandemias. Novas espécies de vírus humanos ainda estão sendo identificadas e os vírus constituem mais de dois terços de todos os novos patógenos humanos⁷. Os vírus patogênicos diferem enormemente em sua importância, variando da doença rara e leve causada pelo vírus Menangle ao impacto devastador do HIV-1 e SARS-CoV-2 na saúde pública. Existem, aproximadamente, 220 espécies de vírus reconhecidos pelo ICTV divididos em 23 famílias que infectam humanos. Nesta seção, descreveremos sobre alguns vírus patogênicos⁸.

1.4.1 Família Flaviviridae

A família *Flaviviridae*, que é uma grande família de patógenos responsáveis por causar doenças em animais e em humanos, é composta por três gêneros: *Flavivirus*, que inclui os vírus da dengue, febre amarela, zika vírus; *Pestivirus*; e *Hepacivirus*, que inclui o vírus da hepatite C⁹.

Os vírions dos *Flavivirus* apresentam um genoma de RNA de fita simples, polaridade positiva, que é empacotado por um capsídeo proteico em uma bicamada lipídica derivada da célula hospedeira envolto por glicoproteínas. O genoma dos *Flavivirus*, de modo geral, apresenta, aproximadamente, 10 kb, com um sítio de leitura que codifica uma única poliproteína⁹. De modo geral, o ciclo viral dos *Flavivirus* se inicia com a ligação dos vírions à célula hospedeira e subsequente entrada na célula por endocitose mediada por clatrina¹⁰. Os *Flavivirus* devem reconhecer uma molécula de superfície celular ubíqua ou utilizar múltiplos receptores para a entrada em células, já que a infecção por *Flavivirus* tem sido observada em uma variedade de linhagens de células derivadas de diferentes espécies hospedeiras¹¹⁻¹³. Em seguida, a acidificação das vesículas endossomais ativa as mudanças conformacionais nos vírions, liberando seu genoma no citoplasma. A fita positiva de RNA é

traduzida em uma poliproteína, que é processada pelas proteases virais e do hospedeiro. A replicação do genoma viral ocorre na superfície do retículo endoplasmático (RE), quando proteínas estruturais e o RNA recém-sintetizado brotam do lúmen do RE. As partículas virais imaturas e não infecciosas são transportadas através do sistema trans-Golgi. As partículas imaturas são clivadas pela protease furina do hospedeiro, resultando em partículas maduras infecciosas, que são liberadas por exocitose¹⁴.

1.4.1.1 Vírus da dengue

O vírus da dengue possui 5 sorotipos e é uma das mais importantes arboviroses de prevalência global, sendo que sua incidência tem aumentado significativamente nas últimas décadas. Antes de 1970, somente nove países apresentaram epidemia de dengue. Atualmente, a doença é endêmica em mais de 100 países, incluindo regiões da África, Américas, Ásia e Pacífico Ocidental¹⁵⁻¹⁷. Em áreas endêmicas, os quatro sorotipos de dengue frequentemente circulam concomitantemente, ou, em alguns casos, os sorotipos circulam ciclicamente, e a possibilidade de múltiplas infecções é comum, sendo que infecções subsequentes com outros sorotipos aumentam o risco do desenvolvimento de dengue hemorrágica¹⁸⁻²⁰. O vírus da dengue é transmitido por mosquitos fêmeas, principalmente das espécies *A. aegypti*, *A. Albopictus* e *A. Polynesiensis*²¹⁻²³. Após a picada do mosquito, o vírus da dengue é inoculado na derme e na epiderme, e alguns vírus também são injetados diretamente na corrente sanguínea, o que resulta na infecção de macrófagos, células dendríticas e células de Langerhans. Essas células infectadas podem migrar do local inicial da infecção para os linfonodos, o que desencadeia o recrutamento de monócitos e macrófagos, que se tornam alvos subsequentes da infecção pelo vírus da dengue. Como resultado, o número e a variedade de células infectadas pelo vírus da dengue aumentam, e a infecção pode se espalhar por todo o sistema linfático, com a infecção de células da linhagem mononuclear, incluindo monócitos derivados do sangue, células dendríticas mieloides e macrófagos esplênicos e hepáticos^{24,25}. Embora a maioria das infecções por dengue seja assintomática, a doença pode

apresentar uma gama de sintomas e sinais clínicos, incluindo febre alta, dor de cabeça severa, dor na região dos olhos, dores musculares e nas juntas, náusea, vômitos e erupção cutânea. Os sintomas frequentemente duram de 2 a 7 dias e aparecem após um período de incubação de 4 a 10 dias após a picada de um inseto infectado. Casos fatais associados à dengue hemorrágica podem ocorrer em 10% dos casos, e 90% das mortes ocorrem em crianças menores de 15 anos de idade²⁶. Entretanto, nas últimas décadas, casos de dengue e dengue hemorrágica têm se tornado mais frequentes em adultos²⁷.

1.4.1.2 Zika vírus

O *Zika vírus*, que emergiu como um recente problema de saúde pública mundial, foi isolado de um macaco do gênero *Rhesus* na floresta Zika, de Uganda, em 1947²⁸. A primeira infecção humana foi reportada na Nigéria, em 1954²⁹, e o primeiro grande surto, que afetou aproximadamente 75% dos residentes, foi reportado na Micronésia, em 2007^{30,31}. O segundo grande surto de infecção por *Zika vírus* afetou a Polinésia Francesa entre 2013 e 2014 e, subseqüentemente, o vírus espalhou-se para outras ilhas do Pacífico³². No início de 2015, o *Zika vírus* foi reportado pela primeira vez nas Américas, no Estado do Rio Grande do Norte³³. Atualmente, a Organização Mundial da Saúde estima que o *Zika vírus* esteja presente em mais de 60 países, incluindo a maioria dos países da América Central e do Sul, Sudeste da Ásia, Oceania e Pacífico, África e Cabo Verde. Assim como o vírus da dengue, a principal via de transmissão do *Zika vírus* é a picada do mosquito *A. aegypti*; porém há fortes evidências de transmissão viral via contato oral e sexual³⁴. Além disso, o vírus também foi encontrado na saliva, no leite materno, no sêmen e na urina³⁵⁻³⁷. Sabe-se que o *Zika vírus* infecta fibroblastos dérmicos humanos, queratinócitos e células dendríticas imaturas³⁸. As anomalias congênitas associadas ao *Zika vírus* sugerem que ele também é capaz de contornar a barreira placentária, e evidências *in vitro* demonstram que o *Zika vírus* pode infectar macrófagos placentários, citotrofoblasto e células progenitoras neurais³⁹⁻⁴¹. Os sintomas e sinais dos pacientes afetados são similares aos da infecção por dengue, apresentando febre, dores nas juntas, erupção cutânea,

fadiga e conjuntivite, embora a maioria dos casos de infecção por *Zika vírus* permaneçam assintomáticos. O quadro clínico da doença pode ter duração de 5 a 7 dias e os sintomas ainda são observados em 50% dos indivíduos após 5 a 8 dias da infecção e em 95% após 12 dias de infecção⁴². As manifestações congênitas da infecção por *Zika vírus* incluem microcefalia, ventriculomegalia, calcificações intracraniais, anormalidades no corpo caloso, lesões na retina, perda de audição e disfagia⁴³⁻⁴⁶.

1.4.1.3 Vírus da febre amarela

A febre amarela é uma doença hemorrágica viral aguda, transmitida por picadas de mosquitos *Aedes ssp* ou *Haemagogus ssp* infectados. O vírus da febre amarela é endêmico nas zonas tropicais da África e na América Central e do Sul^{47,48}. Uma vez contraído, o vírus da febre amarela mantém-se em incubação no corpo durante 3 a 6 dias. Imediatamente após a inoculação do vírus da febre amarela, este, primeiramente, se replica nos linfonodos e, então, dissemina para muitos órgãos, causando lesões, ou por consequência do efeito citopático ou em consequência das alterações secundárias da resposta imune do hospedeiro⁴⁹⁻⁵¹. O quadro clínico da infecção pode variar de uma doença não específica até uma febre hemorrágica fatal. Muitas pessoas não apresentam sintomas, mas, quando estes ocorrem, os mais comuns são febre, dores musculares, sobretudo nas costas, dores de cabeça, perda de apetite, náuseas ou vômitos (período de infecção). Um período de remissão que dura até 48 horas pode seguir o período de infecção, caracterizado pelo desaparecimento dos sintomas e da febre. Os indivíduos com infecções abortivas recuperam-se nesse estágio. No entanto, uma baixa percentagem de doentes (~15%) entra na terceira fase, a fase tóxica, no espaço de 24 horas, após a recuperação dos sintomas iniciais. As febres altas voltam a ocorrer e vários órgãos são afetados, normalmente o fígado e os rins. Nessa fase, é provável que as pessoas desenvolvam icterícia (amarelecimento da pele e dos olhos — daí o nome “febre amarela”), urina escura e dores abdominais com vômitos. Pode ocorrer sangramento da boca, nariz, olhos ou estômago. Metade dos doentes que entram na fase tóxica morrem no

período de 7 a 10 dias. A falência de vários órgãos está associada com altos níveis de citocinas pró-inflamatórias, similares ao que é observado em sepse bacteriana e na síndrome da resposta imune sistêmica. A febre amarela é difícil de diagnosticar, especialmente durante a fase inicial. A doença mais grave pode ser confundida com paludismo grave, leptospirose, hepatite viral (especialmente nas formas fulminantes), outras febres hemorrágicas, infecções com outros *Flavivirus* (e.g., febre hemorrágica do dengue) e envenenamento⁵². O tipo selvagem do vírus da febre amarela é primariamente viscerotrópico, com o fígado sendo o órgão mais afetado; entretanto, o rim, baço, linfonodos, coração e, provavelmente, outros órgãos, também são afetados pelo vírus da febre amarela⁵³.

1.4.1.4 Vírus da hepatite C

A hepatite C é uma doença causada pelo vírus da hepatite C (HCV), pertencente ao gênero *Hepacivirus*, e a infecção pelo HCV é associada tanto a infecções agudas quanto a crônicas, podendo variar de uma doença sutil e autolimitada, durando de semanas, até uma infecção crônica progressiva, com duração de décadas. A infecção aguda pelo HCV é frequentemente assintomática e, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS)⁵⁴, entre 15% e 45% dos pacientes infectados podem espontaneamente curar-se da infecção após seis meses, sem auxílio de nenhum tratamento¹⁷. A resposta imunológica a essa infecção ainda é controversa, mas é senso comum que o sistema imune falhe em gerar uma resposta adaptativa adequada, e que a principal resposta adaptativa contra a infecção seja associada às células T CD4+ e CD8+, e que a exaustão dessas últimas é a principal causa do estabelecimento da infecção crônica⁵⁵. Assim, a evolução para a cronicidade acontece entre 55% e 85% dos casos¹⁷. O vírus da hepatite C apresenta uma prevalência mundial, e as regiões mais afetadas são a Ásia Central, Leste da Ásia e o Norte da África. O vírus da hepatite C é comumente transmitido via uso de agulhas contaminadas^{56,57}, via transfusão sanguínea de sangue contaminado, ou seja, sem a realização de um sistema de triagem eficiente, e menos usualmente via sexual e transmissão vertical. Os sintomas da infecção aguda pelo

vírus da hepatite C incluem febre, fadiga, diminuição de apetite, náusea, vômitos, dor abdominal, urina escura, dores nas juntas e fezes de coloração cinza⁵⁸.

1.4.2 Família *Togaviridae*

1.4.2.1 Vírus *Chikungunya* (CHIKV)

Nos últimos anos, outro agente patogênico transmitido por mosquitos — o vírus *Chikungunya* (CHIKV) — evoluiu de um patógeno relativamente desconhecido e geograficamente isolado para uma ameaça significativa à saúde pública. O vírus *Chikungunya* (CHIKV), o agente causador da febre *Chikungunya* (CHIKF), é um vírus de RNA de fita simples, envelopado e pertencente à família *Togaviridae*. O genoma tem aproximadamente 12 KB de comprimento e codifica as proteínas não estruturais (nsPs) na extremidade 5' e as proteínas estruturais na extremidade 3'⁵⁸. A ligação da glicoproteína E viral aos receptores da célula do hospedeiro medeia a endocitose do vírus, mediada pela clatrina na célula hospedeira. A fusão do envelope viral e da vesícula endossômica libera o nucleocapsídeo no citoplasma. O genoma viral é liberado, seguido pela tradução de proteínas não estruturais, usando o processo de tradução da célula hospedeira, levando à formação da replicase viral. Esta sintetiza uma fita de RNA de sentido negativo, que serve como molde para gerar o RNA de sentido positivo e RNA subgenômico (26S). Isso leva à expressão e à maturação da poliproteína estrutural. A poliproteína é clivada em diferentes proteínas estruturais, e o capsídeo, que se arranja com o genoma para produzir o nucleocapsídeo. O nucleocapsídeo brota da membrana plasmática, enquanto uma parte, originada da membrana plasmática do hospedeiro com glicoproteínas incorporadas, forma o envelope do CHIKV⁵⁹.

É uma doença transmitida por mosquitos aos seres humanos, pelos onipresentes mosquitos *Aedes*, incluindo *A. aegypti* e *A. Albopictus*^{60,61}. Tal como acontece com outras infecções arbovirais, os sintomas podem variar de leves a graves^{62,63}. A fase aguda do *Chikungunya* (CHIKF) geralmente surge abruptamente, embora também possa levar alguns dias. O vírus *Chikungunya* causa febre alta e dor multiarticular grave,

bem como dor muscular, dor de cabeça, náusea, fadiga e erupções cutâneas, que seguem um período médio de incubação de 5 a 7 dias⁶¹. Não diferentemente dos sintomas de outros *Alphavirus* artritogênicos tropicais, o vírus *Chikungunya* pode causar dor articular muito severa; não diferente da febre de dengue, tem duração variável^{62,63}. Esse vírus apresenta um tropismo especial pelo tecido ósseo e articular. Após a fase aguda, o CHIKF é raramente acompanhado por dor articular crônica, episódica e frequentemente debilitante, inchaço, mialgia, fadiga, até depressão e problemas cognitivos. Os pacientes podem desenvolver distúrbios reumáticos crônicos, que não diferem da artrite reumatoide e da espondilite anquilosante⁶⁴.

1.4.3 Família Retroviridae

1.4.3.1 Vírus HIV

Os Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV-1 e HIV-2) pertencem à família *Retroviridae* e são vírus envelopados. A principal diferença entre as duas infecções por esses vírus é que a progressão para a imunodeficiência ocorre de maneira mais lenta em indivíduos infectados por HIV-2, comparados aos indivíduos infectados por HIV-1. Geograficamente, enquanto o HIV-1 apresenta prevalência mundial, o HIV-2 ocorre principalmente na África Ocidental e em comunidades da Europa com ligações socioeconômicas à África Ocidental⁶⁵. O HIV usa a molécula CD4 como um receptor que está presente nas células CD4 +, como linfócitos T, macrófagos, monócitos, células dendríticas e células apresentadoras de antígeno. Um segundo correceptor, além da molécula CD4, é necessário para que o HIV entre na célula hospedeira: CCR5 para macrófago com tropismo para HIV e CXCR4 para linfócitos T com tropismo para HIV. Essa ligação traz mudança conformacional no envelope viral, desencadeando a entrada do vírus na célula hospedeira. Uma vez que a fusão do vírus ocorre com a célula hospedeira, o RNA viral é liberado no citoplasma. O RNA viral é, então, usado para sintetizar o DNA dupla fita pela enzima transcriptase reversa (DNA polimerase dependente de RNA). O DNA dupla fita é então circularizado e entra no núcleo da célula hospedeira. Esse DNA circular dupla fita integra-se ao genoma hospedeiro e o processo é catalisado pela enzima integrase.

Esse tipo de DNA viral integrado no DNA do hospedeiro é conhecido como provírus. Uma vez que o DNA viral esteja integrado, a infecção do HIV é permanente. O vírus HIV pode, então, entrar em latência ou entrar em ciclo produtivo. No ciclo produtivo, o DNA viral é, então, transcrito em mRNA pela RNA polimerase do hospedeiro e, finalmente, traduzido para proteínas virais. Essas proteínas virais são processadas para formar componentes de vírion, que são, então, montados. O vírus da progênie agora amadurece e é liberado por brotamento⁶⁶.

O HIV tem como alvo o sistema imunológico e enfraquece os sistemas de defesa das pessoas contra infecções e alguns tipos de câncer. Como o vírus destrói e prejudica a função das células imunológicas, os indivíduos infectados tornam-se gradualmente imunodeficientes. A imunodeficiência resulta em maior suscetibilidade a uma ampla gama de infecções, cânceres e outras doenças, que pessoas com sistemas imunológicos saudáveis podem combater. A infecção apresenta três estágios: infecção aguda, latência clínica e AIDS⁶⁷⁻⁶⁸. Dentro de 2 a 4 semanas após a infecção, muitas pessoas desenvolvem sintomas semelhantes aos da gripe, frequentemente descritos como “a pior gripe de todos os tempos”. Os sintomas podem incluir febre, glândulas inchadas, dor de garganta, erupção cutânea, dores musculares e articulares e dor de cabeça. Durante esse período inicial da infecção, grandes quantidades de vírus estão sendo produzidas. O vírus usa células CD4 para replicá-las e destruí-las no processo. Por causa disso, a contagem de células CD4 pode cair rapidamente. Após o estágio agudo da infecção pelo HIV, a doença entra em um estágio chamado de “latência clínica”. Durante o estágio de latência clínica, as pessoas infectadas pelo HIV não apresentam sintomas, ou apenas sintomas leves. Nesse estágio, o vírus HIV continua a se reproduzir em níveis muito baixos, mesmo que não possa ser detectado com exames laboratoriais padrão. O terceiro estágio da infecção pelo HIV ocorre quando o sistema imunológico está seriamente comprometido, apresentando o número de suas células CD4 abaixo de 200 células por milímetro cúbico de sangue. Esse estágio, chamado de síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS), pode levar de 2 a 15 anos para se desenvolver, dependendo do

indivíduo^{65,66}. Nesse ponto, é mais provável que o indivíduo infectado desenvolva infecções graves ou doenças bacterianas e fúngicas. Essas infecções são referidas como “infecções oportunistas”. Além disso, o indivíduo pode desenvolver certos tipos de câncer ou outras manifestações clínicas graves⁶⁹.

1.4.4 Família Orthomyxoviridae

1.4.4.1 Vírus Influenza

Existem 3 tipos de vírus da influenza sazonal que infectam humanos: tipos A, B e C. Os vírus *Influenza A* e *B* circulam e causam epidemias sazonais da doença. O vírus *Influenza C* é detectado com menos frequência e, geralmente, causa infecções leves, não apresentando, portanto, importância para a saúde pública⁷⁰. O ciclo replicativo desses vírus se inicia quando a proteína hemaglutinina (HA), uma glicoproteína de superfície viral, reconhece o ácido N-acetilneuramínico (siálico) da superfície da célula hospedeira. Após a ligação da proteína HA do vírus da gripe (ou da Proteína HEF do vírus *Influenza C*) ao ácido siálico, o vírus é endocitado. A acidez do compartimento endossomal é crucial para o desnudamento do vírus. O pH baixo desencadeia alteração conformacional na HA, expondo um peptídeo de fusão que medeia a fusão do envelope viral com o endossomo membrana, abrindo, assim, um poro, através do qual as ribonucleoproteínas (RNPs) virais são liberadas no citoplasma da célula hospedeira. Uma vez liberadas do vírion, as RNPs são direcionadas para o núcleo da célula hospedeira, onde ocorrerá a replicação do RNA viral. As proteínas do envelope são sintetizadas a partir de mRNA de origem viral, em ribossomos ligados à membrana no retículo endoplasmático, onde são dobrados e direcionados para o aparato de Golgi para modificação pós-traducional e subsequente montagem do vírion⁷⁰.

A gripe é uma doença respiratória contagiosa causada pelos vírus *Influenza*. Esses vírus podem causar doença leve a grave e, às vezes, levar à morte. A gripe é diferente de um resfriado e manifesta-se repentinamente. As pessoas que têm a gripe frequentemente apresentam febre, tosse, dor de garganta, nariz escorrendo ou entupido, dores

musculares ou corporais, dores de cabeça e fadiga. Algumas pessoas podem ter vômitos e diarreia, embora isso seja mais comum em crianças do que em adultos. A maioria das pessoas que contraem gripe se recupera em poucos dias, mas algumas desenvolvem complicações, como pneumonia, algumas das quais podem ser fatais. As infecções dos seios da face e do ouvido são exemplos de complicações moderadas da gripe, enquanto a pneumonia é uma complicação grave, que pode resultar da infecção pelo vírus da *Influenza* isolado ou da coinfeção do vírus da gripe e bactérias. Outras possíveis complicações graves desencadeadas pela gripe podem incluir inflamação do coração (miocardite), tecidos do cérebro (encefalite) ou muscular (miosite, rabdomiólise) e insuficiência de múltiplos órgãos (por exemplo, insuficiências respiratória e renal)⁷¹.

1.4.5 Família Herpesviridae

1.4.5.1 Vírus da Herpes Simples (HSV)

Os vírus da herpes simples 1 e 2 pertencem à família *Herpesviridae* e são vírus envelopados com DNA de fita dupla como material genético. O vírion do HSV tem quatro partes: um núcleo contendo DNA viral; uma cápside icosaédrica; um tegumento — uma camada amorfa de proteínas que envolve o capsídeo; e um envelope.

O genoma do HSV é um genoma relativamente longo, com HSV-1 e HSV-2, cada um codificando, pelo menos, 74 genes. No ciclo replicativo, o vírion invade a célula, fundindo seu envelope com a membrana celular. Essa fusão é mediada por glicoproteínas presentes no envelope viral. Uma vez concluída a fusão do envelope, o tegumento viral e o capsídeo são transportados para o núcleo da célula infectada. O tegumento permanece ligado ao capsídeo e segue para o núcleo usando as proteínas do citoesqueleto da célula infectada⁷². Uma vez que o capsídeo atinge o núcleo, o capsídeo injeta o DNA viral linear no núcleo da célula infectada. Após, a supressão da síntese proteica celular do hospedeiro é necessária para o início da replicação do DNA viral. Esse processo é conhecido como desligamento antecipado ou desligamento do hospedeiro associado ao vírion (VHS). As atividades do VHS afetam múltiplas

funções celulares, incluindo a interrupção da síntese de proteínas do hospedeiro e a degradação do mRNA do hospedeiro. O VHS permanece no citoplasma para realizar essas funções, enquanto o capsídeo viral vai diretamente para o núcleo para injetar o genoma viral. Uma vez replicado, o DNA deve ser clivado e rearranjado em um novo capsídeo. A formação de capsídeo prossegue por meio de múltiplos estágios, primeiro pela formação de capsídeos parciais; depois, pela formação de um intermediário de capsídeo esférico fechado; e, finalmente, pela cápside icosaédrica fechada⁷³. Após a formação do nucleocapsídeo, o capsídeo deve sair do núcleo. O capsídeo move-se em direção à membrana interna do núcleo imediatamente antes da formação do invólucro do vírion primário. Uma vez que o capsídeo sai do núcleo, ele forma o tegumento e envelope secundário. O tegumento é formado em dois locais, tanto no capsídeo, quanto no envelope⁷⁴. Esses dois locais de submontagem utilizam dois conjuntos diferentes de proteínas em suas funções. Após a montagem, um vírion maduro é formado dentro de uma vesícula celular. Essa vesícula, então, migra para a membrana celular e se funde com ela para liberar o vírion maduro.

Os vírus da herpes simples estão entre as infecções humanas mais presentes, sendo que 90% da população mundial possui um ou ambos os vírus, e as infecções por esse vírus são vitalícias. O HSV-1 é o vírus mais prevalente, com 54% das pessoas nos Estados Unidos tendo anticorpos para o HSV-1⁷⁵. A epidemiologia na Europa é semelhante, com, pelo menos, metade da população soropositiva para o HSV-1. Nos países em desenvolvimento, o HSV-1 é quase universal, e geralmente adquirido a partir do contato íntimo com a família na primeira infância⁷⁶. O HSV-1 está normalmente associado a infecções orofaciais e encefalite, embora a maioria seja assintomática. As infecções por HSV-2 são marcadamente menos frequentes que as infecções por HSV-1. As taxas de infecção variam de acordo com o país, assim como os níveis de atividade sexual. Em alguns países, como Espanha e Filipinas, a prevalência do HSV-2 gira em torno de 10%, aumentando para 20% a 30% na maioria dos países europeus e nos Estados Unidos⁷⁷⁻⁷⁹. Os países em desenvolvimento apresentam uma carga muito maior de infecção por

HSV-2, com muitas populações na África com uma prevalência maior que 50% na população geral⁸⁰. Como as infecções por HSV-2 são transmitidas quase que exclusivamente durante a atividade sexual, o risco do HSV-2 reflete o nível de atividade sexual de uma pessoa, o número de parceiros e a prevalência de infecção na população. As infecções por herpes, geralmente, não apresentam sintomas, ou sintomas leves que não são reconhecidos. A maioria das pessoas infectadas não sabe que está infectada. Normalmente, cerca de 10%-20% das pessoas com infecção por HSV-2 relatam um diagnóstico prévio de herpes genital⁸¹.

1.4.6 Família Coronaviridae

1.4.6.1 Sars-CoV-2

Os coronavírus são um grupo diversificado de vírus envelopado. O seu genoma é composto por fita de RNA simples com polaridade positiva de aproximadamente 30 KB, apresentando o maior genoma entre os vírus de RNA conhecidos até o momento⁸². Os coronavírus infectam animais diferentes e podem causar infecções respiratórias leves a graves em humanos. Em 2002 e 2012, respectivamente, dois coronavírus altamente patogênicos de origem zoonótica, o coronavírus causador da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV) e o coronavírus causador da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV), surgiram em humanos e causaram doença respiratória fatal. No final de 2019, um novo coronavírus, designado como SARS-CoV-2, surgiu na cidade de Wuhan, China, causando uma pandemia^{83,84}. Até o presente momento, foram reportados 62.378.353 casos confirmados mundialmente com 1.454.819 mortes, sendo 6.290.272 casos de SARS-CoV-2 detectados no Brasil.

As etapas iniciais da infecção do SARS-CoV-2 envolvem a ligação específica da proteína spike (S) com receptores celulares do hospedeiro. Os trímeros S projetam-se do envelope viral derivado do hospedeiro e fornecem especificidade para os receptores de entrada celular. As partículas de coronavírus se ligam a fatores de fixação celular e as interações S específicas com os receptores celulares (como a enzima conversora de angiotensina 2 (ACE2)), juntamente com fatores do

hospedeiro (como a serina protease da superfície celular TMPRSS2) promovem a absorção viral e a fusão na membrana celular ou endossomal. Após a entrada, a liberação e o desencapsulamento, o RNA genômico é traduzido em duas grandes estruturas de leitura aberta, ORF1a e ORF1b, que traduzirão as poliproteínas pp1a e pp1ab, que originarão as proteínas não estruturais que formam o complexo de replicação e transcrição viral. Concordante com a expressão das proteínas não estruturais, são formadas, com a biogênese de organelas de replicação viral consistindo em vesículas, membranas convolutas e pequenas esférulas de membrana dupla abertas, um microambiente protetor para a replicação de RNA genômico viral e transcrição de mRNAs subgenômicos. Após a tradução de proteínas estruturais e acessórias a partir de RNAs subgenômicos, as proteínas estruturais traduzidas se translocam em membranas de retículo endoplasmático (ER) e transitam através do compartimento intermediário ER-para-Golgi, onde a interação com RNA genômico N-encapsulado recém-produzido resulta em brotamento no lúmen dos compartimentos vesiculares secretores. Finalmente, os vírions são secretados da célula infectada por exocitose⁸⁵.

Os sintomas mais comuns de pacientes confirmados com infecção por SARS-CoV-2 são febre, tosse e mialgia ou fadiga, enquanto a produção de expectoração, dor de cabeça, diarreia e vômito são menos frequentes⁸⁶⁻⁸⁸. Os casos leves apresentam apenas febre baixa e fadiga leve, sem pneumonia. Casos graves e moderados apresentam como manifestações clínicas dispneia, linfopenia e hipoalbuminemia, que ocorrem principalmente em pacientes idosos⁸⁶. É importante notar que os pacientes com doença grave ou crítica podem ter febre moderada ou baixa, ou mesmo nenhuma febre significativa. Os idosos e aqueles com doenças crônicas, incluindo diabetes, hipertensão e doenças cardiovasculares, apresentam prognósticos ruins⁸⁹.

1.5 Fármacos antivirais convencionais

Devido a um elevado número de patologias virais existentes, diversas empresas farmacêuticas iniciaram programas para encontrar potenciais fármacos com atividade antiviral. Entretanto, de acordo com a ISIRV (*International Society for Influenza and other Respiratory Virus diseases*) (2017), poucos, de fato, apresentaram-se eficazes, e somente alguns foram licenciados⁹⁰.

Devido ao fato de o vírus ser um parasita intracelular obrigatório, a eficácia de medicamentos que atuassem contra esse antígeno apresentou-se muito baixa. Com a descoberta da existência de enzimas produzidas pelos vírus, as quais muitas vezes estavam diretamente ligadas a determinadas fases de replicação do vírus, começaram a surgir novos fármacos em potencial, inclusive nanomateriais ⁹¹.

A forma de ação dos fármacos antivirais varia de acordo com o tipo de vírus a ser combatido e o tipo de composição química do fármaco; entretanto, a maioria deles segue o mesmo princípio: inibir a etapa de replicação do material genético do vírus ou inibir a etapa de absorção⁹².

De acordo com uma nota emitida pela OMS (Organização Mundial da Saúde), em 2008, alguns vírus têm apresentado resistência aos fármacos já existentes, principalmente de pacientes com tratamento prolongado e imunocomprometidos. Os fármacos antivirais tornam-se mais potentes quando utilizados em terapia combinada, uma vez que a maior parte dos antivirais apresenta baixa potência e é suscetível à resistência por parte do vírus⁹³.

Assim, novas alternativas para o tratamento de viroses estão ganhando destaque nos laboratórios de pesquisa, sendo o uso de nanomateriais antivirais uma alternativa promissora para o combate de diversas viroses.

2. Nanomateriais e vírus

A apresentação de informações referentes à utilização de nanomateriais como antivirais foi dividida em três subgrupos, de acordo com a sua atuação: (i) atuação direta no vírus; (ii) atuação indireta no vírus; e (iii) nanobiossensores para fins diagnósticos.

2.1 Atuação direta no vírus

Este tópico engloba exemplos de plataformas nanoestruturadas com atividade antiviral, cuja forma de ação envolve ação direta na estrutura viral, ou seja, em seu envelope, em seu capsídeo e/ou em seu núcleo.

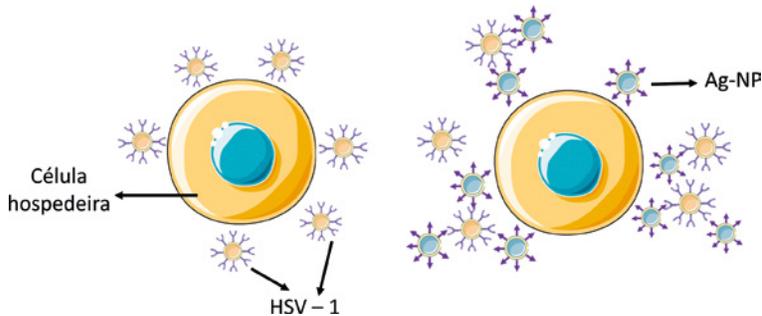
2.1.1 Sistemas nanoestruturados inorgânicos para tratamento de infecção viral

a) Nanopartículas de prata (Ag-NP)

Nanopartículas de prata são um dos nanomateriais mais descritos na literatura. O potencial antiviral dessa nanoestrutura associada ao Mercaptoetano Sulfonato (MES) contra o vírus da Herpes Simples Tipo 1 (HSV-1) já foi descrito, em que se incubaram células com o vírus HSV-1 e diferentes concentrações da nanoestrutura. De acordo com os resultados obtidos *in vitro*, a infecção desse vírus em células incubadas com a nanoestrutura foi praticamente inexistente, quando comparada às células que receberam o vírus sem a adição da nanopartícula, mostrando que estas inativaram sua ação⁹⁴.

As Ag-NP impediram a ligação das glicoproteínas virais do HSV-1 ao sítio de ligação da membrana celular hospedeira. Dessa forma, o vírus não conseguiu reconhecer a célula-alvo e não penetrou pela sua membrana (**Figura 4**). O potencial citotóxico dessas nanopartículas de prata associadas ao MES foi testado em células de mamíferos, que apresentaram 100% de viabilidade. O Mercaptoetano Sulfonato livre apresenta expressiva citotoxicidade; entretanto, quando nanoestruturado, essa toxicidade foi expressivamente minimizada⁹⁴.

Figura 4. Representação do modo de ação de nanopartículas de prata (AgNP) contra o vírus HSV-1. As Ag-NP impedem a ligação das glicoproteínas virais do HSV-1 ao sítio de ligação da membrana da célula hospedeira



Fonte: adaptada de BARAM-PINTO (2009)⁹⁴.

Partículas metálicas, em especial a de prata e a de ouro, normalmente apresentam atividade contra uma grande variedade de vírus. Para tal, sugestivamente, há interação direta entre essas nanopartículas e a proteína viral, uma interação com o núcleo do vírus, ou, ainda, a interação da nanopartícula com glicoproteínas da membrana viral⁹⁵.

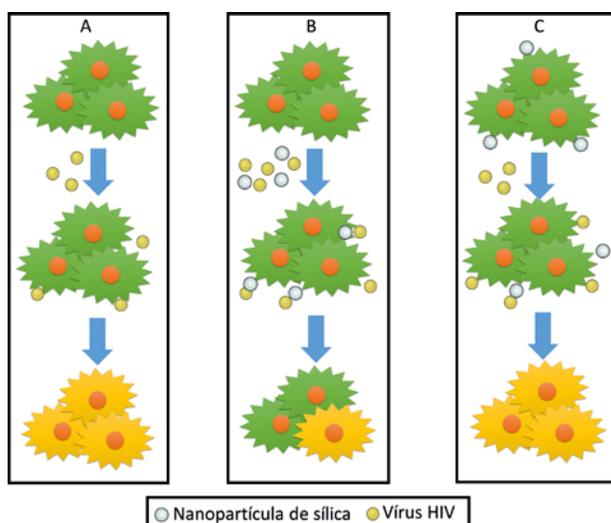
b) Nanopartícula de sílica (Si-NP)

Nanopartículas de sílica são comumente descritas na literatura. Isso ocorre devido às suas características atrativas, tais como notável biocompatibilidade, funcionalidade, facilidade de manipulação e, ainda, por não apresentarem citotoxicidade⁹⁶.

Nanopartículas de sílica já foram utilizadas no tratamento de células *in vitro* infectadas pelo vírus da AIDS, o HIV. Quando não há adição da nanopartícula de sílica, o vírus HIV consegue realizar a transdução do seu material genético em todas as células (**Figura 5 A**). Quando os vírus, incubados anteriormente com nanopartícula de sílica, foram adicionados às células, observou-se que a nanopartícula apresentou potencial para se ligar às glicoproteínas do vírus, impedindo que ele se ligasse e se conectasse às células hospedeiras, e, por consequência, bloqueou sua infecção (**Figura 5 B**). Entretanto, quando a incubação

das nanopartículas foi realizada com a célula, e não com o vírus, observou-se que a nanopartícula não foi capaz de bloquear todos os sítios de ligação célula-vírus, ocorrendo a infecção da célula (**Figura 5 C**). A nanopartícula de sílica não apresentou citotoxicidade às células não infectadas pelo vírus⁹⁷.

Figura 5. Ilustração do processo de atuação da nanopartícula de sílica em vírus HIV. Células verdes representam células normais; células amarelas representam células infectadas



Fonte: adaptada de DE SOUZA E SILVA (2016)⁹⁷.

c) Nanotubos de carbono

Nanotubos de carbono pertencem à família dos fulerenos e apresentam uma nanoestrutura cilíndrica, com propriedades de condução elétrica, térmica e mecânica, e por tal característica têm diversas utilidades, dentre elas, medicinais^{98,99}.

Já foram desenvolvidos nanotubos de carbono associados à porfina, um composto amplamente utilizado em terapias fotodinâmicas para inibir a proliferação do vírus *Influenza*. Quando esse nanomaterial foi submetido à luz visível (emitida por lâmpada fluorescente), houve

expressiva produção de ROS (espécies reativas de oxigênio). Sabe-se que a oxidação produz diversos danos ao vírus, inclusive atuando diretamente no seu material genético, e, por isso, apresentou elevada atividade contra o vírus testado. Entretanto, devido ao fato de a oxidação causar danos às células do organismo, sua ação *in vitro* não foi viável. Dessa forma, a utilização desse nanotubo foi considerada efetiva apenas em modelos *in vitro*, sendo utilizado para combater viroses de águas residuais, podendo, inclusive, ser reutilizado¹⁰⁰.

2.1.2 Sistemas nanoestruturados orgânicos para tratamento de infecção viral

a) Dióxido de titânio (TiO₂)

O dióxido de titânio é um cristal frequentemente utilizado nas indústrias de construção (na produção de tintas, soldaduras, por exemplo), sendo empregado também em pesquisas relacionadas à sua ação contra vírus. Por apresentar estabilidade estrutural, biocompatibilidade e atividades fotocatalíticas importantes, é bastante utilizado para diversos fins¹⁰¹.

Utilizou-se essa capacidade fotocatalítica de TiO₂ para testar sua eficiência contra o vírus H₉N₂ (gripe aviária) *in vitro*. Ao receber ondas de luz com comprimento de 365 nm (luz negra), esse nanomaterial¹⁰² produziu espécies reativas de oxigênio (ROS). Esse potente oxidante atuou contra o vírus, inativando-o sob sua totalidade quando, sugestivamente, oxidou proteínas importantes do vírus. Dessa forma, essa nanopartícula apresentou importante atividade antiviral.

b) Nanomicelas poliméricas

As nanopartículas poliméricas geralmente apresentam como característica a flexibilidade, a estabilidade e o baixo índice de polidispersão, sendo comumente utilizadas como carreadores de fármacos, amplamente empregadas para vetorização de fármacos, principalmente para inibição de crescimento de células cancerígenas e bacterianas¹⁰³.

Apesar disso, micelas poliméricas em escala nanométrica foram utilizadas para destruir uma ampla variedade de vírus, principalmente o HIV, hepatite, influenza e raiva. Essa nanopartícula atua bloqueando os sítios de ligação do vírus, impedindo que este reconheça e se ancore à célula-alvo. Entretanto, sua ação vai além de bloquear os sítios de ligação; ela se funde ao envelope viral, penetrando na estrutura viral, inativando o vírus^{104,105}.

A utilização de nanoviricídeos (nome da micela polimérica desenvolvida pelo laboratório NanoViricides, Inc) como antiviral apresentou diversas vantagens, dentre as quais destacam-se a especificidade ao alvo (vírus) sem gerar efeitos metabólicos adversos; segurança na utilização *in vivo*, por ser biodegradável no organismo; e pela sua ação a um amplo espectro de vírus, incluindo VZV, herpes oral e genital, doenças virais do olho, incluindo EKC e ceratite por herpes, H1N1, gripe suína, gripe aviária H5N1, gripe sazonal, HIV, hepatite C, raiva, dengue e vírus Ebola, entre outros, por diversas rotas de administração — como intravenosa, vacinas — com custos reduzidos^{104,106}. Dessa forma, nanoviricídeos encontram-se em testes pré-clínicos, sendo um potencial fármaco antiviral.

c) Nanoemulsões

Nanoemulsões são exemplos de nanomateriais, por serem constituídas por uma fase oleosa, fase aquosa e um agente surfactante que, juntos, formam gotículas na escala nanométrica^{107,108}. Devido à capacidade de a nanoemulsão se associar a diversos fármacos e direcioná-los às células-alvo, a eficácia do fármaco é aumentada, sendo a dose total necessária para o tratamento reduzida, diminuindo, assim, os efeitos colaterais¹⁰⁹. Além disso, a nanoemulsão diminui a exposição do fármaco às ações externas, como oxidação e hidrólise, preservando sua atividade^{107,110}. Assim, o uso de nanoemulsões tem ganhado atenção, pois supera limitações apresentadas pela administração convencional de fármacos^{111,112}.

Em um estudo recente, avaliou-se o potencial antiviral contra HIV de nanoemulsões associadas à melitina, um peptídeo anfipático encontrado abundantemente no veneno de abelhas, apresentando importante atividade hemolítica. Sua capacidade de interagir e desestabilizar membranas artificiais já é conhecida na literatura, sendo notória sua atividade antifúngica e antibacteriana¹¹³⁻¹¹⁶. Observou-se que essa nanoemulsão agregou-se ao envelope viral, causando uma alteração em sua estrutura. Dessa forma, o envelope viral foi destruído e, portanto, teve sua atividade inibida. A melitina livre apresenta elevada citotoxicidade; entretanto, quando associada à nanoemulsão, essa toxicidade foi amplamente reduzida e direcionada apenas ao vírus em estudo *in vitro*¹¹⁷.

8N8 é um surfactante não iônico, que já apresentou rápida atividade antibacteriana e antiviral. Uma nanoemulsão contendo esse surfactante apresentou atividade antiviral contra o HIV, Herpes, Influenza A e contra vaccínia, atuando de forma similar à nanoemulsão estruturada com melitina, inativando a ação viral pela degradação da membrana lipídica viral. Observou-se também que quando vírus não envelopados foram submetidos a esse nanomaterial, estes permaneceram ativos, mostrando que a ação dessa nanoemulsão está relacionada à interação com bicamadas lipídicas¹¹⁸.

Outro exemplo do uso de nanoemulsões no tratamento de viroses é a nanoemulsão de polissorbato 80 e Indinavir para tratamento de HIV. O Indinavir é um medicamento utilizado no tratamento de HIV para controlar carga viral por mecanismo de inibição de protease; no entanto, não é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica. Essas nanoemulsões contendo o fármaco aumentaram o seu acúmulo no cérebro, por estudo *in vivo*¹¹⁹, sendo este um exemplo de como a nanotecnologia pode ser utilizada para aprimorar tratamentos já existentes.

2.2 Atuação indireta no vírus

Este tópico engloba nanomateriais com atividade antiviral cuja forma de ação foi indireta, ou seja, não teve relação com a estrutura viral, mas impediu a sua proliferação, atuando contra o vetor transmissor, ou ainda, induzindo melhor resposta imunológica por meio de vacina, ou, ainda, carreando fármacos antivirais convencionais. Este último foi considerado como modo de ação indireta, pois quem atua diretamente no vírus é o fármaco, e não o nanomaterial, sendo este apenas carreador da substância.

2.2.1 Atuação contra o vetor transmissor

Muitas viroses são transmitidas por inúmeros vetores. Várias doenças que atingem plantas são transmitidas por insetos, em sua maioria. Isso também é válido para doenças humanas, como a dengue, a febre amarela, a *chikungunya* e a *zika*. Devido a tal fato, o mosquito transmissor dessas doenças tem sido alvo de inúmeras pesquisas, visando ao seu combate como forma de prevenir as viroses^{120,121}.

Nanopartículas de prata associadas ao extrato vegetal extraído de *Hedychium coronarium* (lírio-do-brejo) foram desenvolvidas, sendo avaliado seu potencial contra o mosquito *A. aegypti*, inseto transmissor da dengue, febre amarela, *chikungunya* e *zika*. O nanomaterial apresentou expressiva toxicidade contra o mosquito em diferentes estágios de desenvolvimento, sendo bastante eficiente em todos os estágios larvais e no indivíduo adulto, e menos ativo em pupa. Houve, ainda, notável penetrabilidade à cutícula do animal, devido ao tamanho extremamente pequeno do nanomaterial¹²².

Nanoemulsões também são amplamente utilizadas para o combate de mosquitos transmissores de doenças, em especial, o *A. aegypti*, pois são facilmente associadas a diversos óleos vegetais. O uso de tais óleos associados à nanoemulsão é encontrado em abundância na literatura, tal como *R. officinalis*, *O.basilicum* L., apresentando expressiva toxicidade contra a larva do mosquito¹²³. O uso de nanomateriais associados a extratos vegetais apresenta vantagens quando compa-

rados a inseticidas convencionais. Por se tratar de extratos vegetais, são biodegradáveis, causando menos poluição ao meio ambiente. Além disso, devido à sua alta efetividade, doses pequenas de extratos associados à nanoemulsão seriam suficientes para combater o mosquito, reduzindo os custos e diminuindo os impactos ambientais¹²⁴.

Há, ainda, o uso de nanomateriais como antivectores apenas de alguns mosquitos transmissores de doenças infecciosas, como o *A. aegypti* e *A. stephensi*. Esses vetores são responsáveis pela transmissão de doenças como malária, dengue e *Zika*¹²⁵. Sabendo que há outros inúmeros vetores transmissores de vírus, a busca por novas nanoestruturas aparenta ser um potencial para novas pesquisas.

2.2.2 Vacinas

Vacina é um método utilizado para imunizar um organismo contra determinado patógeno. Trata-se de um método preventivo, em que se busca preparar o sistema imunológico do ser vivo para uma eventual infecção. A vacinação é baseada na inoculação do microrganismo dentro do organismo, de forma que este produza anticorpos que atuem contra o agente invasor. Entretanto, para que a manifestação da doença não ocorra, utiliza-se o microrganismo morto, ou parte de sua estrutura (antígeno), ou, ainda, ele vivo, mas incapaz de causar a doença¹²⁶.

Os programas de vacinação foram responsáveis pela erradicação de algumas doenças, como a poliomielite, hepatite A, difteria, tétano, rubéola, entre outras. No entanto, há viroses que sofrem mutações, por exemplo, o vírus da gripe, sendo a imunização realizada anteriormente não eficaz à nova estrutura viral. Além disso, não existem vacinas para todos os vírus causadores de doenças, como o vírus da AIDS. Dessa forma, novas alternativas para combater esses antígenos são interessantes no aspecto medicinal. A nanotecnologia tem sido utilizada como ferramenta para o desenvolvimento e o aprimoramento de vacinas, pois se utilizando nanopartículas poliméricas, por exemplo, pode-se conferir ao sistema maior atividade imunogênica; proteção

contra atividade enzimática e direcionamento a tipos específicos de células^{127,128}.

Os principais tipos de nanossistemas utilizados para a imunização e a encapsulação de antígenos são os lipossomos, as vesículas multilamelares com bicamada interligadas (ICMVs – do inglês, *interbilayer-cross-linked multilamellar vesicles*), nanomicelas catiônicas e aprisionamento por polímeros biocompatíveis, como a quitosana¹²⁷.

Nanoemulsões do tipo água/óleo/água, associadas ao vírus da *Influenza* H5N1 inativado, foram testadas como vacinas *in vitro*. De acordo com os resultados obtidos, houve uma resposta imunológica do organismo semelhante à vacinação sem a utilização de nanoestrutura; entretanto, a resposta com o sistema nanoestruturado foi mais rápida e mais potente. Isso representa uma relação de custo-efetividade em relação à produção das vacinas e imunização mais rápida da população, evitando que ocorram pandemias^{128,129}.

2.2.3 Carreadores de fármacos

A utilização de fármacos convencionais utilizados para o combate de vírus causadores de doenças é bastante aplicada em inúmeras viroses. Entretanto, há alguns pontos que devem ser levantados quanto à sua eficácia. Primeiramente, quando o medicamento entra no corpo do organismo, ele estará exposto a todas as células, e não apenas ao vírus; desse modo, diversos medicamentos acabam agredindo células e tecidos não alvo, causando diversos efeitos colaterais. Além disso, as doses comumente são mais elevadas e podem sobrecarregar o organismo.

A utilização de plataformas nanoestruturadas como carreadores desses fármacos antivirais diminui expressivamente os efeitos adversos causados ao organismo, uma vez que tais sistemas atuam diretamente nos vírus ou nas células infectadas, e podem ser efetivos em doses reduzidas¹³⁰.

Dentre os diversos tipos de nanomateriais que podem servir como carreadores de fármacos antivirais, os lipossomos mostraram-se bastante eficientes quando associados a anticorpos específicos de determinados vírus, como os vírus da família Hepatite, Influenza e RSV¹³¹. Baseado em outro modelo de carregamento de fármacos (nanopartículas poliméricas), um modelo de vacina foi desenvolvido para HIV-1 com agonistas TRL5, que aprimorou a imunização em estudo *in vivo*¹³².

2.3 Nanobiossensores para fins diagnósticos

Biossensores são elementos biológicos que reconhecem determinado organismo ou substância. A principal característica de um bom modelo de diagnóstico é a detecção de moléculas exclusivas da doença em seus estágios precoces e converter essa molécula em um sinal suficientemente forte diante dos sinais emitidos por outras moléculas que não são de interesse¹³³.

A utilização de materiais nanoestruturados tem proporcionado aos métodos de diagnóstico já existentes maiores níveis de sensibilidade e especificidade. Adicionalmente, novos modelos de detecção estão sendo desenvolvidos, utilizando tal tecnologia. Nanopartículas poliméricas ou magnéticas podem ser utilizadas para carrear anticorpos em imunoenaios, assim como sensores de tamanhos nanométricos estão sendo desenvolvidos para aumentar os sinais de detecção¹³⁴.

Desse modo, este tópico aborda alguns nanomateriais utilizados na detecção prévia dos vírus, indicando suas presenças em determinado organismo *in vitro* ou *in vivo*, e, ainda, a classificação quanto aos tipos de vírus.

2.3.1 Sílica magnética modificada

Sílica magnética modificada já foi utilizada para reconhecer três vírus considerados letais: HIV (vírus causador da AIDS) e os vírus causadores de herpes: HVB e HCV, melhorando o prognóstico dessas morbidades. A partir do magnetismo do nanomaterial por eles nanoestruturados, foi possível purificar o ácido nucleico do vírus, mesmo em pequenas

quantidades, devido à sua alta sensibilidade. Posteriormente, marcou-se esse ácido nucleico com fluorescência e, por quimioluminescência, conseguiu-se detectar a presença desses vírus. Dessa maneira, apenas uma pequena quantidade de amostra é necessária para identificação da presença de vírus, mesmo em seu estágio inicial de contaminação, permitindo um diagnóstico mais rápido e eficiente¹³⁵.

2.3.2 Nanopartícula de ouro

Nanopartículas de ouro estão sendo amplamente utilizadas como nanobiossensores para a detecção de vírus. A obtenção de nanopartículas de ouro associadas a anticorpos específicos de determinados vírus pode ser um grande avanço para diagnósticos clínicos. O nanometal foi estruturado com o anticorpo específico do vírus da dengue. Esse anticorpo se liga ao antígeno NS1, que é exclusivo desse vírus. Essa nanoestrutura emite sinais mecânicos e ópticos, capazes de sinalizar a presença do vírus em células de mosquito *A. albopictus*, e, ainda, a qual tipo ele pertence¹³⁶.

Nanoestruturas de ouro associadas a um anticorpo, com a finalidade de detectar o antígeno p24 do HIV, também já foram evidenciadas. O diagnóstico da doença pôde ser obtido muito mais rápido que as formas convencionais de detecção¹³⁷. Outros estudos com o vírus HIV estão sendo desenvolvidos com nanotecnologia e detecção por microscopia eletrônica, assim como antígenos combinados com espectrometria, para detecção desse vírus em estágios mais iniciais de infecção¹³⁸.

De uma forma geral, esses nanobiossensores podem contribuir significativamente para o controle e a prevenção da propagação de viroses contagiosas, como é o caso do HIV, herpes vírus, entre outras.

2.4 Antivirais à base de nanotecnologia: testes clínicos e comercialização

Alguns materiais nanoestruturados já estão sendo comercializados ou em fase de testes clínicos. O InflexalV® é um exemplo de uma vacina que utiliza nanotecnologia para imunização. Com os lipossomos, é

possível mimetizar a estrutura do vírus da Influenza e produzir atividade imunogênica¹³⁹. Adicionalmente, já se encontram em fase de testes clínicos os antirretrovirais nanoencapsulados NANOEfavirenz® e NANOLopinavir®¹⁴⁰. Os medicamentos Epaxal® e Influvac® são vacinas lipossomais, utilizadas para imunização contra hepatite A e vírus *Influenza*, respectivamente.

Os medicamentos silenciadores de genes Fluquit™ e Cervisil® são nanoformulações baseadas em polímeros da empresa Sinaomics, e estão em estágio de teste pré-clínico para tratamento do vírus H5N1 / H1N1 e HPV, respectivamente. Em fase de testes clínicos estão os medicamentos Doravirine®, uma formulação à base de nanopartículas para tratamento de HIV, e o ARB-001467 TKM-HBV, nanopartícula lipídica carreando três diferentes RNA de interferência, para ser utilizada no tratamento do vírus da hepatite B¹⁴¹.

2.5 Nanotecnologia e SARS-CoV-2

A redação deste capítulo de livro foi concluída antes do início da pandemia causada pelo SARS-CoV-2. Por isso, o texto não traz detalhes da utilização da nanotecnologia especificamente contra esse vírus, mas as abordagens aqui discutidas também se aplicam. De qualquer forma, os autores gostariam de destacar que inúmeras estratégias promissoras foram desenvolvidas durante o período da pandemia, e mais informações específicas podem ser encontradas nas referências indicadas¹⁴²⁻¹⁵³.

3. Conclusão

Apesar de serem extremamente simples, os vírus podem infectar praticamente qualquer organismo vivo, uma vez que são parasitas obrigatórios. De um modo geral, os vírus influenciam a vida de seus hospedeiros, podendo interferir em seu desenvolvimento, em sua qualidade de vida e até mesmo ocasionar o óbito. Economicamente, as viroses podem acarretar perdas importantes quando se abordam plantações

e rebanhos. Já quanto aos aspectos sociais, estão associados a pandemias, novas doenças e até mesmo viroses reemergentes, causando diversas mortes.

Como os vírus ficam ativos dentro das células, fármacos com ação específica são dificilmente encontrados, além do fato de estes serem altamente suscetíveis a mutações, apresentando resistência a muitos fármacos desenvolvidos. Por esse aspecto, tem-se investido cada vez mais em componentes farmacológicos capazes de inativar os vírus, ou até mesmo impedi-los de penetrar nas células hospedeiras; inibir seu desenvolvimento, atuando em seus vetores; em vacinas; e em biossensores para detectar a presença dos vírus, sendo a utilização de nanomateriais bastante promissora e amplamente estudada para esse fim.

Há diversos nanomateriais com atividade antiviral na literatura, sendo, em sua maioria, nanometais. A forma de ação dos nanomateriais, de um modo geral, está relacionada à inibição da ligação do vírus com sua célula hospedeira ou à transcrição do material genético. Estudos com nanomateriais antivirais apontam resultados promissores, com alguns ensaios pré-clínicos e clínicos iniciados.

Adicionalmente, a utilização de nanomateriais como nanobiossensores apresenta um grande potencial para a melhora de diagnósticos precoces e mais precisos de diversas doenças virais. Nesse mesmo aspecto, a nanovacina pode contribuir para a diminuição de gastos para sua produção, apresentando uma capacidade de imunização mais rápida e mais eficiente. Por último, a perspectiva da utilização de nanomateriais como antivectores pode ser potencialmente benéfica ao combate de viroses transmitidas por insetos ou, até mesmo, outros vetores, uma vez que estudos têm levantado a hipótese de que causem menos impactos ambientais e sejam mais eficientes, devido às baixas dosagens dos fármacos associados a nanomateriais e à alta efetividade contra o vetor.

4. Referências

1. STEPHENS, Paulo R. S. et al. Virologia. In: Molinaro, Etelcia; Caputo, Luzia; Amendoeira, Regina. (Org.). **Conceitos e métodos para a formação de profissionais em laboratórios de saúde**. 1 ed. Rio de Janeiro: Escola Politécnica de Saúde Joaquim Venâncio - EPS-JV, 2010. Cap. 2, p. 125-220.
2. CANN, Alan. **Principles of Molecular Virology**. 6. ed. Cambridge: Academic Press, 2015. 318 p.
3. CARTER, G. R.; WISE, D. J.; Flores, E. F. **A Concise Review of Veterinary Virology**. 1 ed. New York: International Veterinary Information Service, 2005.
4. LUCAS, William. Viral capsids and envelopes: Structure and function. **eLS**. Disponível em: < <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9780470015902.a0001091.pub2>> Acesso em: 25 ago. 2018.
5. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias**. Guia de bolso. 8 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. 444 p.
6. LUNA, Expedito J. A. A emergência das doenças emergentes e as doenças infecciosas emergentes e reemergentes no Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.5, n. 3, p.229-243, 2002.
7. WOOLHOUSE, Mark; GAUNT, Eleanor. Ecological origins of novel human pathogens. **Critical reviews in microbiology**, v. 33, n. 4, p. 231-242, 2007.
8. WOOLHOUSE, Mark et al. Human viruses: discovery and emergence. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 367, n. 1604, p. 2864-2871, 2012.
9. KNIFE, D. M.; HOWLEY, P. M. **Fields virology**. 6. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. 2664 p.
10. SMIT, J. M. et al. Flavivirus cell entry and membrane fusion. **Viruses**, v. 3, n. 2, p.160-71, fev. 2011.

11. HILGARD, P.; STOCKERT, R. Heparan sulfate proteoglycans initiate dengue virus infection of hepatocytes. **Hepatology**, v. 32, n. 5, p.1069-77, nov. 2000.
12. GERMI, R. et al. Heparan sulfate-mediated binding of infectious dengue virus type 2 and yellow fever virus. **Virology**, v. 292, n. 1, p.162-8, jan. 2002.
13. RODENHUIS-ZYBERT, I. A. et al. Dengue virus life cycle: viral and host factors modulating infectivity. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 16, p.2773-86, aug. 2010.
14. MUKHOPADHYAY, S. et al. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 1, p.13-22, jan. 2005.
15. BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p.504-507, abr. 2013.
16. MUSTAFA, M. S. et al. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. **Medical Journal Armed Forces India**, v. 71, n. 1, p.67-70, jan. 2015.
17. World Health Organization. Hepatitis C. Disponível em: < <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>>. Acesso em: 25 ago. 2018.
18. GUZMAN, M. G. et al. Dengue: a continuing global threat. **Nature Reviews Microbiology**, v. 8, n. 12 Suppl, p.S7-16, dec. 2010.
19. SCREATON, G. et al. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nature Reviews Immunology**, v. 15, n. 12, p.745-59, dec. 2015.
20. DEJNIRATTISAI, W. et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nature Immunology**, v. 17, n. 9, p.1102-8, sep. 2016.
21. WILDER-SMITH, A.; SCHWARTZ, E. Dengue in travelers. **The New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 9, p.924-32, sep. 2005.

22. WEARING, H. J.; ROHANI, P. Ecological and immunological determinants of dengue epidemics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 103, n. 31, p.11802-11807, aug. 2006.
23. PATTERSON, J. et al. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **The Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p.671-679, nov. 2016.
24. JOHNSTON, L. J. et al. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p.560-568, mar. 2000.
25. MAROVICH, M. et al. Human dendritic cells as targets of dengue virus infection. **Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings**, v. 6, n. 3, p.219-224, dec. 2001.
26. RIGAU-PEREZ, J. G. et al. The reappearance of dengue-3 and a subsequent dengue-4 and dengue-1 epidemic in Puerto Rico in 1998. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 67, n. 4, p.355-362, oct. 2002.
27. SAM, S. S. et al. Review of Dengue hemorrhagic fever fatal cases seen among adults: a retrospective study. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 5, p.e2194, 2013.
28. DICK, G. W. et al. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p.509-520, set. 1952.
29. MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p.139-45, mar. 1954.
30. LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 8, p.1232-1239, aug. 2008.

31. DUFFY, M. R. et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine** v. 360, n. 24, p.2536-2543, jun. 2009.
32. PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 7, p.1185-1192, jul. 2016.
33. ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 4, p.569-572, jun. 2015.
34. MOREIRA, J. et al. Sexually acquired Zika virus: a systematic review. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 23, n. 5, p.296-305, may. 2017.
35. KUTSUNA, S. et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014 [corrected]. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 4, jan. 2014.
36. BARZON, L. et al. Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 10, p.30159, 2016.
37. COLT, S. et al. Transmission of Zika virus through breast milk and other breastfeeding-related bodily-fluids: A systematic review. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p.e0005528, abr. 2017.
38. HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p.8880-96, sep. 2015.
39. LI, C. et al. Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p.672, nov. 2016.
40. QUICKE, K. M. et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. **Cell Host Microbe**, v. 20, n. 1, p.83-90, jul. 2016.
41. TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p.587-590, may. 2016.

42. LESSLER, J. et al. Times to key events in Zika virus infection and implications for blood donation: a systematic review. **Bull World Health Organ**, v. 94, n. 11, p.841-849, nov. 2016.
43. LEAL, M. C. et al. Characteristics of Dysphagia in Infants with Microcephaly Caused by Congenital Zika Virus Infection, Brazil, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 8, p.1253-1259, aug. 2017.
44. MITTAL, R. et al. A Possible Association Between Hearing Loss and Zika Virus Infections. **JAMA Otolaryngology – Head & Neck Surgery**, v. 144, n. 1, p.3-4, out. 2017.
45. OZKURT, Z.; TANRIVERDI, E. C. Global Alert: Zika Virus-an Emerging Arbovirus. **The Eurasian Journal of Medicine**, v. 49, n. 2, p.142-147, jun. 2017.
46. SOUSA, A. Q. et al. Postmortem Findings for 7 Neonates with Congenital Zika Virus Infection. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 7, p.1164-1167, jul. 2017.
47. VASCONCELOS, P. F. Yellow fever in Brazil: thoughts and hypotheses on the emergence in previously free areas. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, n. 6, p.1144-9, dez. 2010.
48. MONATH, T.P. Review of the risks and benefits of yellow fever vaccination including some new analyses. *Expert Review of Vaccines*, v.11, n. 4, p.427-448, abr.
49. MONATH, T. P. Yellow fever: Victor, Victoria? Conqueror, conquest? Epidemics and research in the last forty years and prospects for the future. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 45, n. 1, p.1-43, jul. 1991.
50. QUARESMA, J. A. et al. Revisiting the liver in human yellow fever: virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF-beta, TNF-alpha and NK cells activity. **Virology**, v. 345, n. 1, p.22-30, fev. 2006.
51. QUARESMA, J. A. et al. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Reviews in Medical Virology**, v. 23, n. 5, p.305-318, set. 2013.

52. MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 11-20, ago. 2001.
53. MONATH, T. P.; BARRETT, A. D. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. **Advances in Virus Research**, v. 60, p. 343-395, 2003.
54. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Note, 2009. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/resp/oms_nota12.pdf> Acesso em: 26 ago. 2018.
55. REHERMANN, B. Pathogenesis of chronic viral hepatitis: differential roles of T cells and NK cells. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p.859-868, jul. 2013.
56. ESTEBAN, J. I. et al. The changing epidemiology of hepatitis C virus infection in Europe. **Journal of Hepatology**, v. 48, n. 1, p.148-162, jan. 2008.
57. TOHME, R. A.; HOLMBERG, S. D. Transmission of hepatitis C virus infection through tattooing and piercing: a critical review. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 8, p.1167-1178, abr. 2012.
58. FIELDS, B. N. et al. **Fields virology**. 4. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001.
59. SUBUDHI, B. B. et al. Current Strategies for Inhibition of Chikungunya Infection. **Viruses**, v. 10, n. 5, mai. 2018.
60. VEGA-RUA, A. et al. High level of vector competence of Aedes aegypti and Aedes albopictus from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **Journal of Virology**, v. 88, n. 11, p.6294-6306, jun. 2014.
61. DONALISIO, M. R. et al. Arboviruses emerging in Brazil: challenges for clinic and implications for public health. **Revista de Saude Publica**, v. 51, p.30, abr. 2017.
62. STAPLES, J. E. et al. Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, n. 6, p.942-948, set. 2009.

63. MEJIA, C. R.; LOPEZ-VELEZ, R. Tropical arthritogenic alphaviruses. **Reumatol. Clin.**, v. 14, n. 2, p.97-105, mar. 2018.

64. SISSOKO, D. et al. Post-epidemic Chikungunya disease on Reunion Island: course of rheumatic manifestations and associated factors over a 15-month period. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 3, p.e389, 2009.

65. NYAMWEYA, S. et al. Comparing HIV-1 and HIV-2 infection: Lessons for viral immunopathogenesis. **Reviews in Medical Virology**, v. 23, n. 4, p.221-240, jul. 2013.

66. BARRE-SINOUSSE, F. et al. Past, present and future: 30 years of HIV research. **Nature Reviews Microbiology** v. 11, n. 12, p.877-883, dez. 2013.

67. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Act against AIDS. Disponível em: < <https://www.cdc.gov/actagainstaids/index.html>> Acesso em: 25 ago. 2018.

68. AVERT. Global information and education on HIV and AIDS. Disponível em: < <https://www.avert.org/>> Acesso em: 25 ago. 2018.

69. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. HIV-Risk Reduction Tool. Disponível em: < <https://wwwn.cdc.gov/hivrisk/>> Acesso em: 25 ago. 2018.

70. BOUVIER, N. M.; PALESE, P. The biology of influenza viruses. **Vaccine**, v. 26 Suppl 4, p.D49-53, set. 2008.

71. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION CDC), C. F. D. C. A. P. Flu Symptoms & Complications. Disponível em: https://www.cdc.gov/flu/symptoms/symptoms.htm?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Fwww.cdc.gov%2Fflu%2Fconsumer%2Fsymptoms.htm> Acesso em: 25 ago. 2018.

72. ZAICHICK, Sofia V. et al. The herpesvirus VP1/2 protein is an effector of dynein-mediated capsid transport and neuroinvasion. **Cell host & microbe**, v. 13, n. 2, p.193-203, 2013.

73. NEWCOMB, William W. et al. Assembly of the herpes simplex virus capsid: characterization of intermediates observed during cell-free capsid formation. **Journal of Molecular Biology**, v. 263, n. 3, p.432-446, 1996.
74. METTENLEITER, Thomas C.; MINSON, Tony. Egress of alphaherpesviruses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 3, p.1610-1612, 2006.
75. BRADLEY, H. et al. Seroprevalence of herpes simplex virus types 1 and 2--United States, 1999-2010. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 3, p.325-333, fev. 2014.
76. WHITLEY, R. J. et al. Changing presentation of herpes simplex virus infection in neonates. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 158, n. 1, p.109-16, jul. 1988.
77. SMITH, J. S. et al. Prevalence and risk factors for herpes simplex virus type 2 infection among middle-age women in Brazil and the Philippines. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 28, n. 4, p.187-194, abr. 2001.
78. VARELA, J. A. et al. Herpes simplex virus type 2 seroepidemiology in Spain: prevalence and seroconversion rate among sexually transmitted disease clinic attendees. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 28, n. 1, p.47-50, jan. 2001.
79. MALKIN, J. E. et al. Seroprevalence of HSV-1 and HSV-2 infection in the general French population. **Sexually Transmitted Diseases**, v. 78, n. 3, p.201-203, jun. 2002.
80. WEISS, H. A. et al. The epidemiology of HSV-2 infection and its association with HIV infection in four urban African populations. **AIDS**, v. 15 Suppl 4, p.S97-108, ago. 2001.
81. WORLD HEALTH ORGANIZATION. Herpes simplex virus. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/herpes-simplex-virus>> Acesso em: 25 ago. 2018.
82. WOO, Patrick CY et al. Coronavirus diversity, phylogeny and inter-species jumping. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 10, p. 1117-1127, 2009.

83. ZHU, Hengbo; WEI, Li; NIU, Ping. The novel coronavirus outbreak in Wuhan, China. **Global health research and policy**, v. 5, n. 1, p. 1-3, 2020.
84. ZHU, Na et al. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, p. 727, 2020.
85. V'KOVSKI, Philip et al. Coronavirus biology and replication: implications for SARS-CoV-2. **Nature Reviews Microbiology**, 2020.
86. CHEN, Guang et al. Clinical and immunologic features in severe and moderate forms of Coronavirus Disease 2019. **J Clin Invest**, v. 130, p. 2620-2629, 2020.
87. QIU, Haiyan et al. Clinical and epidemiological features of 36 children with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Zhejiang, China: an observational cohort study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 20, p. 689-696, 2020.
88. TIAN, Sijia et al. Characteristics of COVID-19 infection in Beijing. **Journal of Infection**, v. 80, p. 401-406, 2020.
89. CHINA. National Health Commission of the People's Republic of China. New coronavirus pneumonia prevention and control program. Disponível em: <<http://www.nhc.gov.cn/yzygj/s7653p/202003/46c9294a7dfe4cef80dc7f5912eb1989.shtml>> Acesso em: 4 abr. 2020.
90. ISIRV (International Society for Influenza and other Respiratory Virus Diseases). Disponível em: < <https://www.isirv.org>> Acesso em: 25 ago. 2018.
91. EVERTS, Maaïke et al. Accelerating drug development: antiviral therapies for emerging viruses as a model. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 57, p.155-169, jan. 2017.
92. DE CLERCQ, Erik. The discovery of antiviral agents: ten different compounds, ten different stories. **Medicinal Research Reviews**, v. 28, n. 6, p.929-953, nov. 2008.

93. GRIFFITHS, Paul D. A perspective on antiviral resistance. **Journal of Clinical Virology**, v. 46, n. 1, p.3-8, set. 2009.
94. BARAM-PINTO, Dana et al. Inhibition of herpes simplex virus type 1 infection by silver nanoparticles capped with mercaptoethane sulfonate. **Bioconjugate Chemistry**, v. 20, n. 8, p.1497-1502, ago. 2009.
95. TAMILSELVAN, Selvaraj; ASHOKKUMAR, Thirunavukkarasu; GOVINDARAJU, Kasivelu. Microscopy based studies on the interaction of bio-based silver nanoparticles with Bombyx mori Nuclear Polyhedrosis virus. **Journal of Virological Methods**, v. 242, p.58-66, 2017.
96. LIBERMAN, Alexander et al. Synthesis and surface functionalization of silica nanoparticles for nanomedicine. **Surface Science Reports**, v. 69, n. 2, p.132-158, set. 2014.
97. DE SOUZA E SILVA, Juliana Martins et al. Viral Inhibition Mechanism Mediated by Surface-Modified Silica Nanoparticles. **ACS Applied Materials & Interfaces**, v. 8, n. 26, p.16564-16572, jul. 2016.
98. AJAYAN, Pulickel M.; TOUR, James M. Materials science: nanotube composites. **Nature**, v. 447, n. 7148, p.1066, jun. 2007.
99. XAVIER, Janet R. et al. Advanced nanomaterials: promises for improved dental tissue regeneration. In: KISHEN, Anil. **Nanotechnology in Endodontics**. 1 ed. Cham: Springer, 2015. Cap. 1, p.5-22.
100. BANERJEE, Indrani et al. Light-activated nanotube-porphyrin conjugates as effective antiviral agents. **Nanotechnology**, v. 23, n. 10, p.105101, mar. 2012.
101. MACWAN, D. P.; DAVE, Pragnesh N.; CHATURVEDI, Shalini. A review on nano-TiO₂ sol-gel type syntheses and its applications. **Journal of Materials Science**, v. 46, n. 11, p.3669-3686, 2011.
102. CUI, Haixin et al. Photocatalytic Inactivation Efficiency of Anatase Nano-TiO₂ Sol on the H9N2 Avian Influenza Virus. **Photochemistry and photobiology**, v. 86, n. 5, p.1135-1139, out. 2010.

- 103.SCHAFFAZICK, Scheila Rezende et al. Caracterização e estabilidade físico-química de sistemas poliméricos nanoparticulados para administração de fármacos. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p.726-737, 2003.
- 104.JAIN, Kewal K. Nanomedicine: application of nanobiotechnology in medical practice. **Medical principles and practice**, v. 17, n. 2, p.89-101, 2008.
- 105.DIWAN, Anil R. Nanoviricides: Novel Antiviral Nanomedicines Innovation, Regulation, and Investments. Disponível em: <<https://www.internano.org/nmsummit/sites/internano.org.nmsummit/files/Diwan-0926p.pdf>> Acesso em: 25 ago. 2018.
- 106.NANOVIRICIDES INC. Disponível em: <<http://www.nanoviricides.com/>>. Acesso em: 25 ago. 2018.
- 107.SHARMA, Navneet et al. Preparation and optimization of nanoemulsions for targeting drug delivery. **International Journal of Drug Development and Research**, v. 5, n. 4, p.37-48, 2013.
- 108.SAJJADI, S.; ZERFA, M.; BROOKS, B. W. Phase inversion in p-xylene/water emulsions with the non-ionic surfactant pair sorbitan monolaurate/polyoxyethylene sorbitan monolaurate (Span 20/Tween 20). **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 218, n. 1-3, p.241-254, 2003.
- 109.BERCIANO-GUERRERO, M. A. et al. Nanoparticles in melanoma. **Current Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 32, p.3701-3716, 2014.
- 110.MOHANRAJ, V. J.; CHEN, Y. Nanoparticles- a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, n. 1, p.561-573, 2006.
- 111.WILCZEWSKA, Agnieszka Z. et al. Nanoparticles as drug delivery systems. **Pharmacological Reports**, v. 64, n. 5, p.1020-1037, 2012.
- 112.LI, Jun et al. Recent advances in targeted nanoparticles drug delivery to melanoma. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, v. 11, n. 3, p.769-794, abr. 2015.

113. TOSTESON, M. T. et al. Melittin lysis of red cells. **The Journal of Membrane Biology**, v. 87, n. 1, p.35-44, 1985.
114. DEMPSEY, Christopher E. The actions of melittin on membranes. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Biomembranes**, v. 1031, n. 2, p.143-161, 1990.
115. PICOLI, Tony et al. Antiviral and virucidal potential of melittin and apamin against bovine herpesvirus type 1 and bovine viral diarrhoea virus. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, n. 4, p.595-604, 2018.
116. SILVA, Tânia et al. Unravelling a Mechanism of Action for a Cecropin A-Melittin Hybrid Antimicrobial Peptide: The Induced Formation of Multilamellar Lipid Stacks. **Langmuir**, v. 34, n. 5, p.2158-2170, fev. 2018.
117. HOOD, Joshua L. et al. Cytolytic nanoparticles attenuate HIV-1 infectivity. **Antiviral Therapy**, v. 18, n. 1, p.95-103, 2013.
118. HAMOUDA, Tarek et al. A novel surfactant nanoemulsion with a unique non-irritant topical antimicrobial activity against bacteria, enveloped viruses and fungi. **Microbiological Research**, v. 156, n. 1, p.1-7, 2001.
119. PRABHAKAR, Kandadi et al. Tween 80 containing lipid nanoemulsions for delivery of indinavir to brain. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 3, n. 5, p.345-353, 2013.
120. TEIXEIRA, Maria da Glória; BARRETO, Maurício Lima; GUERRA, Zouraide. Epidemiologia e medidas de prevenção da dengue. **Informe epidemiológico do SUS**, v. 8, n. 4, p.5-33, 1999.
121. FINKEL, Adam M. et al. A “solution-focused” comparative risk assessment of conventional and synthetic biology approaches to control mosquitoes carrying the dengue fever virus. **Environment Systems and Decisions**, v. 38, n. 2, p.177-197, 2018.
122. KALIMUTHU, Kandasamy et al. Control of dengue and Zika virus vector *Aedes aegypti* using the predatory copepod *Megacyclops formosanus*: synergy with *Hedychium coronarium*-synthesized silver nanoparticles and related histological changes in targeted

- mosquitos. **Process Safety and Environmental Protection**, v. 109, p.82-96, 2017.
- 123.GHOSH, Vijayalakshmi; MUKHERJEE, Amitava; CHANDRASEKARAN, N. Formulation and characterization of plant essential oil based nanoemulsion: evaluation of its larvicidal activity against *Aedes aegypti*. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. Supplementary Issue, p.S321, 2013.
- 124.DURÁN, Nelson et al. Nanobiotechnology Solutions against *Aedes aegypti*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, n. 7, p.1139-1149, 2016.
- 125.OSANLOO, Mahmoud et al. Nanoemulsion of Dill essential oil as a green and potent larvicide against *Anopheles stephensi*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, n. 7, p.6466-6473, mar. 2018.
- 126.BALLALAI, Isabela & BRAVO, Flávia. Imunização. Tudo o que você precisa saber. Sociedade Brasileira de imunizações (SBIm). Disponível em: < <https://sbim.org.br/images/books/imunizacao-tudo-o-que-voce-sempre-quis-saber.pdf>> Acesso em: 25 ago. 2018.
- 127.SULCZEWSKI, Fernando B. et al. Nanoparticle vaccines against viral infections. **Archives of Virology**, v. 163, n. 9, p. 2313-2325, set. 2018.
- 128.CHATTOPADHYAY, Saborni et al. Nanoparticle vaccines adopting virus-like features for enhanced immune potentiation. **Nanotheranostics**, v. 1, n. 3, p.244-260, jun. 2017.
- 129.EHRLICH, Hartmut J. et al. A clinical trial of a whole-virus H5N1 vaccine derived from cell culture. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 24, p.2573-2584, 2008.
- 130.TORRECILLA, Josune et al. Lipid nanoparticles as carriers for RNAi against viral infections: current status and future perspectives. **BioMed Research International**, v. 2014, Article ID 161794, 17 pages, 2014.

131. DE SERRANO, Luis O.; BURKHART, David J. Liposomal vaccine formulations as prophylactic agents: design considerations for modern vaccines. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 15, n. 1, p. 83, ago. 2017.
132. ROSTAMI, Hajar et al. Co-utilization of a TLR5 agonist and nano-formulation of HIV-1 vaccine candidate leads to increased vaccine immunogenicity and decreased immunogenic dose: a preliminary study. **Immunology Letters**, v. 187, n. 1, p.19-26, nov. 2017.
133. OCHMANN, Sarah E. et al. Optical Nanoantenna for Single Molecule-Based Detection of Zika Virus Nucleic Acids without Molecular Multiplication. **Analytical Chemistry**, v. 89, n. 23, p.13000-13007, dez. 2017.
134. TAEBI, Saeed; KEYHANFAR, Mehrnaz; NOORBAKHS, Abdollah. A novel method for sensitive, low-cost and portable detection of hepatitis B surface antigen using a personal glucose meter. **Journal of Immunological Methods**, v. 458, p.26-32, jul. 2018.
135. ALI, Zeeshan et al. Simultaneous detection of multiple viruses based on chemiluminescence and magnetic separation. **Biomaterials Science**, v. 5, n. 1, p.57-66, dez. 2017.
136. CARTER, James R. et al. A novel dengue virus detection method that couples DNase and gold nanoparticle approaches. **Virology Journal**, v. 10, n. 1, p.201, jun. 2013.
137. TEEPARUKSAPUN, Kosin et al. Ultrasensitive detection of HIV-1 p24 antigen using nanofunctionalized surfaces in a capacitive immunosensor. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 20, p.8406-8411, 2010.
138. LEE, Jin-Ho; OH, Byung-Keun; CHOI, Jeong-Woo. Development of a HIV-1 virus detection system based on nanotechnology. **Sensors**, v. 15, n. 5, p.9915-9927, 2015.
139. WEISSIG, Volkmar; PETTINGER, Tracy K.; MURDOCK, Nicole. Nanopharmaceuticals (part 1): products on the market. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p.4357, 2014.

140. VENTOLA, C. Lee. Progress in nanomedicine: approved and investigational nanodrugs. **Pharmacy and Therapeutics**, v. 42, n. 12, p.742, 2017.
141. SINGH, Lavanya et al. The role of nanotechnology in the treatment of viral infections. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, v. 4, n. 4, p.105-131, 2017.
142. LUZ, Glécia Virgolino da Silva; JOANITTI, Graziella Anselmo; PINHEIRO, Wagner Moreira. Uso da nanotecnologia em ações contra a pandemia do COVID-19. In: DUARTE, Aldira Guimarães; AVILA, Carlos F. Domínguez. A COVID-19 NO BRASIL: ciência, inovação tecnológica e políticas públicas. Curitiba: Crv, 396 p, 2020.
143. CHAN, Warren CW. Nano Research for COVID-19. **ACS nano**, v. 14, p. 3719-3720, 2020.
144. CHEN, Lu; LIANG, Jiangong. An overview of functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents. **Materials Science and Engineering: C**, v. 112, p. 110924, 2020.
145. NIKAEEN, Ghazal; ABBASZADEH, Sepideh; YOUSEFINEJAD, Saeed. Application of nanomaterials in treatment, anti-infection and detection of coronaviruses. **Nanomedicine**, v.15, p. 1501-1512, 2020.
146. SPORTELLI, Maria Chiara et al. Can Nanotechnology and Materials Science Help the Fight against SARS-CoV-2. **Nanomaterials**, v. 10, n. 4, p. 802, 2020.
147. RUIZ-HITZKY, Eduardo et al. Nanotechnology responses to COVID-19. **Advanced healthcare materials**, v. 9, n. 19, p. e2000979, 2020.
148. CAMPOS, Estefânia VR et al. How can nanotechnology help to combat COVID-19? Opportunities and urgent need. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 18, n. 1, p. 125, 2020.

149. BHAVANA, Valamla et al. COVID-19: Pathophysiology, treatment options, nanotechnology approaches, and research agenda to combating the SARS-CoV2 pandemic. **Life Sciences**, v. 261, p. 118336, 2020.
150. JONES, Georgia Wilson et al. No small matter: a perspective on nanotechnology-enabled solutions to fight COVID-19. **Nanomedicine**, v. 15, n. 24, p. 2411-2427, 2020.
151. PALESTINO, Gabriela et al. Can nanotechnology help in the fight against COVID-19?. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 18, n. 9, p. 849-864, 2020.
152. WEISS, Carsten et al. Toward Nanotechnology-Enabled Approaches against the COVID-19 Pandemic. **ACS Nano**, v. 14, p. 6382-6406, 2020.

CAPÍTULO 9

Nanotecnologia aplicada para tratamentos de cicatrização e regeneração tecidual

Marcella L. B. Carneiro^{1,3,*}; Glécia V. S. Luz^{1,2}; Christian R. Q. Quijia³; Thamis F. Santana¹; Luna A. N. de Carvalho²; Lourdes M. Brasil^{1,2}

1. Introdução

Desde o século XX, vários materiais têm sido investigados visando à regeneração tecidual tornando, assim, sua aplicação notável para a indústria médica¹. De acordo com a origem e o tipo de ferida, vários produtos estão disponíveis no mercado. Sistemas combinados com nanotecnologia, como a incorporação de nanopartículas em biomateriais ou o emprego de nanopartículas como um veículo para *drug delivery*, fornecem uma promissora opção para a entrega de agentes bioativos com características químicas distintas e que possuem potencial aplicação na regeneração tecidual². Nesse contexto, nanopartículas biocompatíveis, ao transportar e liberar fármacos bioativos de maneira controlada e sustentada, podem melhorar significativamente a eficácia terapêutica de fármacos na medicina regenerativa e cicatricial de feridas em comparação com tratamentos convencionais empregados atualmente. Por exemplo, a administração tópica de NPs carregadas de fármacos, por exemplo, pode permitir melhor adesão à derme e, com isso, melhorar a eficácia do fármaco na pele³.

1. Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica, Faculdade Gama, Universidade de Brasília, Brasil.

2. Laboratório de Nanotecnologia NANOTEC-FGA/UnB, Faculdade Gama, Universidade de Brasília, Brasil.

3. Programa de Pós-Graduação em Nanociência e Nanobiotecnologia, Faculdade Darcy Ribeiro, Universidade de Brasília, Brasil.

* E-mail: marbretas@gmail.com

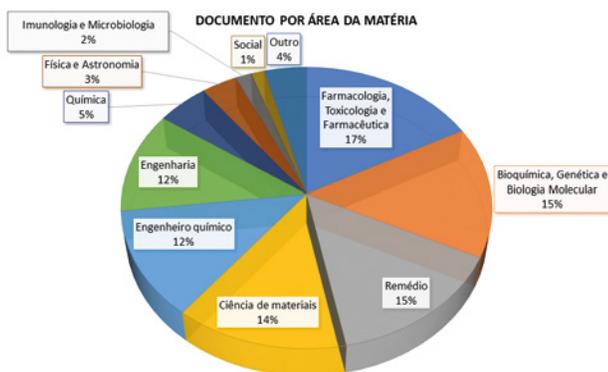
Um componente central da indústria de nanotecnologia são nanopartículas (NPs) projetadas. O número de produtos de consumo que contêm NPs está crescendo a um ritmo acelerado a cada ano. Nas últimas duas décadas, as NPs emergiram como uma nova classe de terapêutica, devido à sua capacidade de ser alvo específica e de ter baixa toxicidade⁴.

As NPs são geralmente definidas como partículas que variam de 1 nm a 1.000 nm de tamanho. As propriedades inovadoras desses materiais, em virtude do seu tamanho, podem incluir alterações em pontos de fusão, áreas de superfície, propriedades ópticas específicas, forças mecânicas e magnetizações. Devido à aquisição dessas propriedades únicas decorrentes do seu tamanho nanométrico, as NPs tornam-se atraentes para várias aplicações industriais e médicas e, dentre as últimas, grandes pesquisas têm sido realizadas no campo da medicina regenerativa nas últimas duas décadas⁵.

Muitos processos biológicos ocorrem por meio de mecanismos que atuam fundamentalmente na escala nanométrica. Assim, materiais como NPs podem ser usados como ferramentas únicas para processos de administração de fármacos⁶.

Na **Figura 1** são apresentadas as áreas envolvidas nas 135 publicações encontradas por meio de pesquisa realizada na base de dados Scopus, entre os anos de 2008 e 2018, utilizando-se a string de busca: (*“wound healing” OR regeneration OR cicatrix OR “granulation tissue” OR “fracture healing”*) AND nanotechnology AND nanoparticles).

Figura 1: Porcentagem de publicações sobre Nanopartículas e Cicatrização de Feridas (*string utilizado: “wound healing” OR regeneration OR cicatrix OR “granulation tissue” OR “fracture healing”*) AND nanotechnology AND nanoparticles)



Fonte: Scopus. Publicações de 2008 a 2018. Elaborada pelos autores. Acesso em 2 de agosto de 2018.

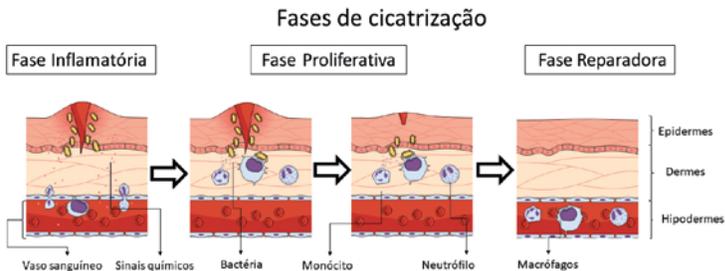
Dos resultados encontrados (**Figura 1**), observou-se que as áreas relacionadas aos 135 documentos são: 17% na “Farmacologia, Toxicologia e Farmacêutica”; 15% em “Fármacos”, 15% em “Bioquímica, genética e Biologia Molecular”; 12% em “Engenharia Química” e “Engenharia”; entre outros. Tais dados revelam, no contexto da cicatrização de feridas, que as propriedades especiais de NPs como condutividade elétrica, atividade antimicrobiana, alta relação superfície/volume, dentre outras, são importantes para sua aplicação nas áreas relacionadas.

De acordo com vários estudos, citados neste capítulo, têm sido demonstrados que as NPs podem acelerar o processo de cura em feridas crônicas graves, visto que podem melhorar o processo de cicatrização por apresentar potencial para associar diversos fármacos que inibem a inflamação excessiva, isquemia e infecção na ferida, além de poder favorecer a revascularização do tecido lesado (**Tabelas 2, 3 e 4**).

A cicatrização de feridas consiste em um dinâmico e complexo processo de regeneração e crescimento dos tecidos e ocorre em quatro fases diferentes, sendo elas: a coagulação e a hemóstase (fase imediatamente após a lesão); a fase inflamatória, (logo após a lesão no tecido) durante a qual ocorre o inchaço; o período de proliferação, em que novos tecidos e vasos sanguíneos são formados; e a fase de maturação, em que a remodelação de novos tecidos ocorre (**Figura 2**). Essas fases ocorrem em uma ordem que se sobrepõe uns com os outros em uma cascata integrada. A promoção dessas fases depende, em grande parte, do tipo de ferida e suas condições patológicas associadas⁷.

Figura 2: Processo de cicatrização de feridas. Fase inflamatória:

Ocorre a ativação do sistema de coagulação sanguínea e a liberação de mediadores químicos, podendo haver edema, vermelhidão e dor. Fase proliferativa: é a fase da regeneração. Nela ocorre a proliferação de fibroblastos. Nesse período, as células endoteliais se proliferam, resultando em rica vascularização e infiltração de macrófagos. Esse conjunto forma o tecido de granulação. Na fase reparadora, a densidade celular e a vascularização são diminuídas, resultando na remodelação do tecido cicatricial (formado na fase anterior). As fibras são realinhadas para aumentar a resistência do tecido e induzir à cicatrização. Nessa fase, a cicatriz altera progressivamente sua tonalidade, passando do vermelho-escuro a um tom rosa-claro



Fonte: Adaptado de Mandelbaum et al., 2003⁷.

Neste capítulo, abordaremos algumas pesquisas relacionando o uso de diferentes tipos de nanopartículas para cicatrização e regeneração tecidual. Nas seções a seguir, falaremos, especificamente, de várias terapias baseadas em NPs que estão sendo avaliadas em pesquisas pré-clínicas ou que se encontram em uso clínico nos últimos anos.

2. Tipos de nanopartículas aplicadas para tratamentos de cicatrização e regeneração tecidual

Nanopartículas metálicas (NpsMet)

O uso de Nanopartículas Metálicas (NpsMet) remonta da antiguidade. Por exemplo, nanopartículas de cobre (NpsCu) eram adicionadas pelos egípcios em vidro, tornando-o de coloração vermelha intensa, e também nanocristais de sulfeto de chumbo (PbS) eram utilizados em tinturas de cabelo ^{8,9}. Outros exemplos de uso de NpsMet são descritos em estudos de vitrais coloridos utilizados para adornar capelas medievais ^{10,11}.

Dentre as diversas aplicações das NpsMet, têm sido utilizadas para aumentar o sinal oriundo de moléculas orgânicas mediante a técnica de Espectroscopia Raman¹², para amplificar sinais de fluorescência; para produzir células solares sensibilizadas por corantes¹³, catálise ¹⁴; como antioxidante¹⁵ e cicatrizante¹⁵⁻¹⁸, no uso em dispositivos antimicrobianos^{19,20}, ópticos, eletrônicos e biossensores²⁰⁻²²; em sistemas de entrega de fármacos (*drug delivery*)^{13,16,20,23} e em nanodispositivos ²², dentre outros.

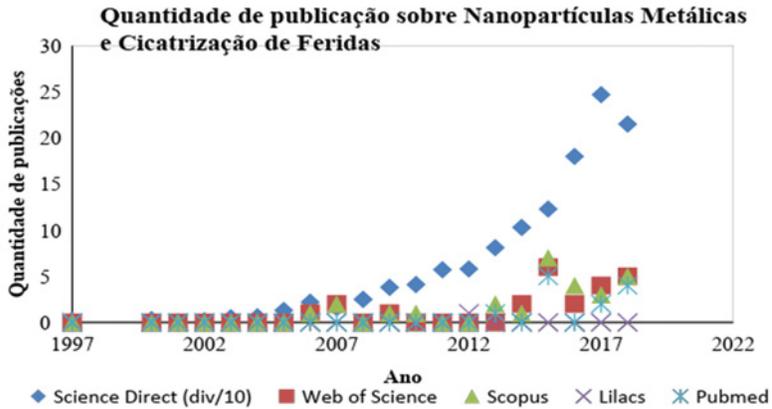
Especificamente, nanopartículas de metais nobres como ouro, prata, paládio e platina têm despertado grande interesse devido ao seu reduzido tamanho e à grande área de superfície em relação ao seu volume ^{24,25}, além das especificidades relacionadas aos materiais em

nanoescala com relação às suas peculiares características ópticas, elétricas, magnéticas e biológicas^{22,26}.

Por pesquisas realizadas nas bases de dados científicos Scopus, Web of Science, Lilacs, Scielo, Science Direct e Pubmed/Medline, em agosto de 2018, com o termo “*metallic nanoparticle**”, foram encontrados, respectivamente, 5.840, 5.766, 34, 50, 10.810 e 250 documentos. Quando se filtram essas informações acerca de publicações relacionadas à (“*metallicnanoparticle**”) AND (“*woundhealing*” OR *regeneration* OR *cicatrix* OR “*granulationtissue*” OR “*fracturehealing*”), os resultados das buscas tornam-se 27, 23, 1, 0, 1.238 e 12 documentos, respectivamente. O período de busca não foi limitado e se estabeleceu para qualquer idioma.

Assim, como é mostrado na **Figura 3**, há um aumento consideravelmente alto na quantidade de publicações sobre estudos de cicatrização de feridas com o uso de NpsMet. A base Science Direct, a qual dispõe do maior acervo de publicações, caracteriza-se por apresentar 50% das publicações como artigos originais e 22% como revisões de literatura. Isto é, pesquisas experimentais sobre o assunto estão em pleno desenvolvimento na comunidade científica.

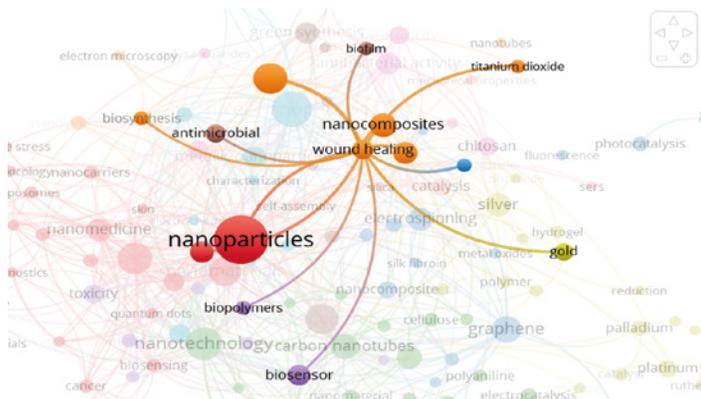
Figura 3: Quantidade de publicações sobre nanopartículas metálicas e cicatrização de feridas



Fontes: Science Direct, Web of Science, Scopus, Lilacs e Pubmed/Medline. Elaborada pelos autores. Acesso em 2 de agosto de 2018.

Outra evidência do desenrolar das atividades nesse campo de estudo com NpsMet, cicatrização de feridas e regeneração tecidual encontra-se ao se analisar os resultados das buscas na base de dados *Science Direct* sobre as recorrências entre termos específicos nas publicações, os quais são apresentados nas **Figuras 4 a 6** a seguir.

Figura 6: Avaliação do grupo relacionado à cicatrização (em inglês, *wound healing*) com suas interrelações, nas publicações sobre nanopartículas metálicas, cicatrização de feridas e regeneração tecidual



Fonte: *Science Direct* e análise no software VOSviewer 1.6.8 (2018) ²⁸.
Elaborada pelos autores. Acesso em 2 de agosto de 2018.

Nas **Figuras 4, 5 e 6**, são mostrados os termos obtidos pela recorrência entre os 1.238 trabalhos publicados na base de dados *Science Direct* sobre o tema, especificamente no título, palavras-chaves e resumo. Além disso, também se mostram os inter-relacionamentos entre elas, representados pelas linhas que as conectam e pelas cores. A quantidade de recorrências encontradas para cada termo é representada pelo tamanho do círculo correspondente a cada uma, isto é, quanto maior o tamanho do círculo, mais vezes esse termo apareceu nas publicações analisadas.

Dessa forma, as maiores recorrências foram encontradas com relação às palavras destacadas na **Tabela 1** a seguir.

Tabela 1. Termos com maior recorrência em publicações sobre nanopartículas metálicas, cicatrização de feridas e regeneração tecidual

Ordem	Termo*	Recorrências	Ordem	Termo*	Recorrências
1	<i>Nanoparticles</i>	110	16	<i>Metallicnanoparticles</i>	22
2	<i>Silver nanoparticles</i>	62	17	<i>Antibacterialactivity</i>	22
3	<i>Nanotechnology</i>	52	18	<i>Antibacterial</i>	21
4	<i>Drug Delivery</i>	48	19	<i>Tissueengineering</i>	20
5	<i>Gold nanoparticles</i>	44	20	<i>Biosensor</i>	19
6	<i>Nanomaterials</i>	42	21	<i>Biosensors</i>	19
7	<i>Graphene</i>	35	22	<i>Catalysis</i>	18
8	<i>CarbonNanotubes</i>	32	23	<i>Chitosan</i>	18
9	<i>Silver</i>	27	24	<i>Biomaterials</i>	17
10	<i>Electrospinning</i>	25	25	<i>Biocompatibility</i>	17
11	<i>Nanoparticle</i>	25	26	<i>Toxicity</i>	17
12	<i>Nanomedicine</i>	25	27	<i>Woundhealing</i>	16
13	<i>Nanocomposites</i>	25	28	<i>Cytotoxicity</i>	16
14	<i>Green Synthesis</i>	23	29	<i>Platinum</i>	15
15	<i>Adsorption</i>	22			

Fontes: Science Direct e análise no software VOSviewer 1.6.8 (2018)²⁸. Elaborada pelos autores. Acesso em 2 de agosto de 2018.

Na **Tabela 1**, são demonstradas as pesquisas entre os diversos materiais estudados para cicatrização de feridas e regeneração tecidual. Nesse contexto, as nanopartículas de prata, de ouro e de platina são as mais avaliadas pela comunidade acadêmica atualmente. Assim, confirma-se que desde o trabalho de Michael Faraday, em 1857, sobre as propriedades óticas de filmes finos de nanopartículas de ouro e de outros metais, as pesquisas com nanopartículas metálicas têm crescido exponencialmente. Isso é refletido diretamente no avanço tecnológico da área, e no aumento das suas aplicações diretamente à sociedade, como é mostrado nas **Figuras 3 a 6** e **Tabela 1**, e tem-se como exemplo a aplicação em pacientes com feridas provocadas por *Diabetes mellitus* ^{16,29-33}.

Com relação às nanopartículas magnéticas, estas serão tratadas no próximo tópico, em que destacaremos mais informações sobre suas aplicações na cicatrização de feridas e regeneração tecidual.

Nanopartículas magnéticas (NpsMg)

Nanopartículas do tipo magnéticas possuem um comportamento que pode mudar do ferromagnético ou ferrimagnético para superparamagnéticos, de tal forma que as nanopartículas se orientam mais facilmente a favor do campo magnético externo aplicado, e se desmagnetizam quando retirado esse campo externo ^{34,35}. Ao se vislumbrarem aplicações em biomedicina, devem-se considerar alguns requisitos desses materiais, como uniformidade na morfologia, baixa polidispersão, tamanho e, dependendo da via de administração a ser usada, por exemplo via endovenosa, possuir características hidrofílicas, favorecendo a distribuição na corrente sanguínea e evitando a aglomeração nos vasos ^{35,36}.

Na medicina, as nanopartículas magnéticas são usadas para várias abordagens, como a separação de células magnéticas ou Ressonância Magnética (RM) ³⁷. Reporta-se na literatura científica uma variedade de nanopartículas com comportamento magnético. Entre as mais comuns, atualmente, estão as nanopartículas de óxido de Fe como a magnetita (Fe_3O_4), que possuem comportamento superparamagnéticos ³⁸⁻⁴⁴, toxicidade tolerável ⁴⁵. É retratado que essas nanopartículas são eliminadas do corpo por meio do sistema retículo endotelial (RES) ^{46,47}.

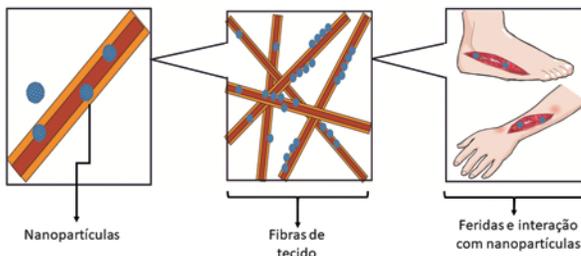
Há mais de 30 anos, as nanopartículas magnéticas têm sido investigadas para aplicações biomédicas. Em pesquisa na base de dados científicos SCOPUS (SCOPUS, 2018) com o termo “*magnetic nanoparticle**” (no título, palavras-chaves ou resumo), encontraram-se 18.298 trabalhos no período de 2008 a 2018. Quando se observa, nesse mesmo período, a *string* (código contendo as palavras-chaves de interesse) (“*magneticnanoparticle** AND (*health OR healthcare*)), encontram-se 408. Ao se filtrarem esses documentos com a *string* (“*woundhealing*” OR *regeneration OR cicatrix OR “granulationtissue” OR “fracturehea-*

ling”) AND “magneticnanoparticle”) e para apenas artigos, revisões ou capítulos de livros nas áreas: engenharia, medicina ou farmácia, foram encontrados 150 documentos.

Desses trabalhos, selecionaram-se 12 artigos/revisões que contivessem informações sobre o tema proposto. Para melhor apresentação, os dados foram dispostos em uma tabela (**Tabela 2**) contendo os seguintes itens: Autores, Tipo de Estudo, Objetivo (s) do trabalho, Nanopartículas/Nanoestruturas magnéticas citadas, potenciais aplicações e Resultados obtidos pelo trabalho.

Os trabalhos selecionados demonstraram pesquisas com nanopartículas magnéticas de níquel³⁹ e óxido de ferro^{38,39,42,43}. Observou-se o uso de nanopartículas magnéticas, principalmente de óxido de ferro, em conjugações/funcionalizações com fibras de celulose^{38,48} (**Figura 7**), fibras de seda⁴¹, curcumina³³, peptídeos³⁹, células endoteliais⁴², anticorpos²¹, microRNA⁴⁹, dentre outros. Tais materiais foram reportados ter utilização como curativos, terapia cicatrizante e antimicrobial.

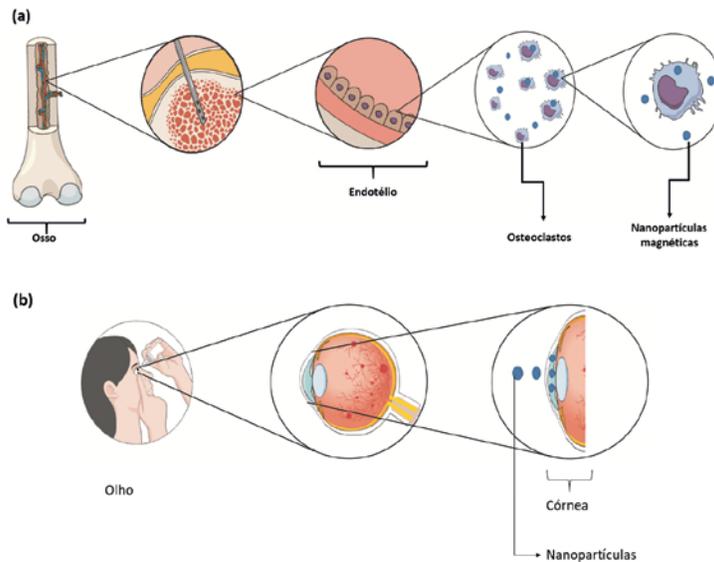
Figura 7: Dentre aplicações de nanopartículas magnéticas, elas são utilizadas em conjugações, por exemplo com fibras de celulose ou seda



Fonte: elaborada pelos autores.

Verificou-se também uma ampla aplicação em tecidos de diversos locais como em tecidos de pele dorsal ⁵⁰, tecido ósseo ⁴⁸ (**Figura 8a**) e endotélio da córnea ^{33,42} (**Figura 8b**). No caso do trabalho de Krismastuti *et al.*, nanopartículas magnéticas com terminação de ácido carboxílico (imuno-magNPs) foram utilizadas como biossensores fotônicos para a detecção seletiva de diferentes tipos de metaloproteinasas de matriz (MMPs) para o prognóstico da cicatrização de feridas e consequente acompanhamento da condição desta ²¹.

Figura 8: Aplicações de nanopartículas magnéticas para (a) regeneração de tecido ósseo e (b) do endotélio da córnea



Fonte: elaborada pelos autores.

Perante tais achados, observou-se que o interesse da comunidade acadêmica tem crescido progressivamente, e essa tecnologia tem evoluído de forma que seus resultados e aplicações efetivas à sociedade sejam uma realidade em um curto espaço de tempo, conforme é apresentado na **Tabela 2**.

Tabela 2. Trabalhos sobre informações de materiais contendo nanopartículas/nanoestruturas magnéticas aplicadas no tratamento de feridas e regeneração tecidual

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
38	Bayer et al. (2011)	Artigo	Demonstrar uma técnica simples e eficiente com propriedades multifuncionais em redes de fibras de celulose, com soluções de monômero de etil-cianoacrilato contendo partículas submicrométricas orgânicas suspensas ou nanopartículas inorgânicas.	Nanopartículas de $MnFe_2O_4$.	Folhas de celulose antimicrobiana podem ser usadas como curativo em medicina.	Demonstram uma técnica de baixo custo, escalável, e processo verde capaz de tornar qualquer tipo de material celulósico fibroso multifuncional. Características como: responsividade magnética, atividade antibacteriana, entre outras, foram alcançadas.
39	Brandelli (2012)	Revisão	O presente trabalho discute as possíveis aplicações de nanopartículas no transporte e na entrega de peptídeos antimicrobianos.	Nanopartículas de níquel; Nanopartículas de óxido de ferro.	Nanopartículas de níquel magnético uniformemente revestidas com biofilme poliacrílico podem ser utilizadas para imobilização de peptídeo antimicrobiano; as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro podem ser utilizadas revestido-as com vários polímeros.	O autor conclui que peptídeos antimicrobianos incorporados a nanocarreadores podem controlar a presença de bactérias patogênicas, melhorando também a estabilidade, eficácia e sua entrega nos tecidos.
43	Kim et al. (2013)	Artigo	Desenvolver e validar uma plataforma de termoterapia com nanopartícula magnética antimicrobiana (NSPMA) que poderia especificamente visar e matar bactérias em um modelo de cultura in vitro do biofilme de <i>S. aureus</i> e em um modelo de rato de infecção cutânea por <i>S. aureus</i> .	Nanopartículas de Fe_3O_4 .	NSPMAnti-Staphylococcus aureus NSPMAnti-IgG como agentes antimicrobianos resultando em melhoria da cicatrização de feridas.	Foi desenvolvida uma plataforma de termoterapia antimicrobiana magnética utilizando NSPMA direcionados a anticorpos e campo magnético alternado (CMAs) de alta frequência e alta amplitude, e foi validada sua eficácia na rápida depuração de patógenos de <i>S. aureus</i> in vitro e in vivo em um modelo de rato com infecção da ferida cutânea.

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
33	Yallapu et al. (2015)	Revisão	Este trabalho pretende fornecer uma visão geral de uma eficiente nanoformulação de curcumina como opção terapêutica direcionada para diversas doenças humanas. Discutem-se as evidências clínicas, o status atual e as oportunidades futuras de nanoformulação (s) de curcumina (s) no campo da medicina.	Curcumina encapsulada com nanopartículas magnéticas.	Nanopartículas magnéticas de curcumina podem aumentar a temperatura sob um campo magnético externo e promover atividade antimicrobiana.	Os autores mostram publicações que relatam sistemas comumente usados para fornecer curcumina com uso de nanopartículas magnéticas, as quais podem ser usadas para fins multifuncionais, incluindo a administração de drogas (curcumina), RM e hipertermia.
42	Cornell et al. (2016)	Artigo	O trabalho avaliou a biocompatibilidade de SPIONPs em CEC bovinos. Especificamente, a viabilidade e estrutura do citoesqueleto de CECs expostos a SPIONPs na presença de uma força magnética.	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticos (SPIONPs) conjugadas com células endoteliais.	Usar nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticos (SPIONPs) como guias para células endoteliais da córnea (CECs) às áreas lesadas através de força magnética externa sem alterar sua morfologia ou viabilidade.	Os autores observaram que a exposição de nanopartículas aos CECs teve impacto mínimo na viabilidade e estrutura das células. Verificou-se que a exposição magnética inicial teve um efeito benéfico na viabilidade, o que ajudaria no reparo celular e seria uma interessante alternativa a procedimentos cirúrgicos.
40	Brett et al. (2017)	Artigo	O presente estudo analisou os efeitos da regulação positiva de Bcl-2 mediada por minicirculo usando magnetofecção na diferenciação osteogênica e um novo perfil pré-fabricado para transfectar células estromais derivadas de tecido adiposo (CTA) após implantação de um modo temporoespacialmente controlado para estimular a regeneração óssea.	Núcleos de óxido de ferro revestidos sequencialmente com polietilenoimina ramificada, plasma minicirculo codificador de proteína verde fluorescente e Bcl-2 e poli-b-aminooéster.	Direcionamento ao local-alvo e aumento da velocidade de regeneração óssea e da cicatrização de feridas.	Os autores mostraram que, por meio de transfecção assistida magnética de um minicirculo que expressa Bcl-2, aumentaram a expressão do gene de interesse, a proliferação celular e a redução dos marcadores de apoptose comparados com CTA-nucleofecção. Além disso, o novo perfil pré-fabricado ligado à NPmg permite o controle temporoespacial in situ para pós-implante da transfecção celular para amplificar a regeneração óssea.

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
48	Hao et al. (2017)	Artigo	Investigar se as funções dos macrófagos relacionados à regeneração do tecido ósseo podem ser moduladas empregando uma estrutura superparamagnética após a magnetização e para esclarecer os mecanismos subjacentes.	Nanofibras contendo nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ nanopartículas de hidroxapatita.	Regeneração de tecido ósseo.	Houve inibição da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e MCP-1, bem como as citocinas de diferenciação de osteoclastos MMP-9 e TRAP, e up-regulando VEGF e PDGF. Os meios condicionados estimularam a osteogênese dos osteoblastos e a angiogênese das células endoteliais.
50	Heun et al. (2017)	Artigo	Desenvolver uma técnica de transferência de genes baseada no direcionamento magnético de complexos de nanopartículas-lentivírus magnéticos (NPMg-LV), permitindo a entrega de genes em locais para feridas na pele dorsal de ratos.	Complexos de nanopartículas-lentivírus magnéticos (NPMg-LV).	Influência positiva na angiogênese de tecidos.	Os autores relataram que não apenas alcançaram a expressão gênica diferencial desejada em sítios definidos do mesmo tecido usando o direcionamento magnético de partículas magnéticas e lentivirais, mas também informam um papel decisivo na hipertrofia e angiogênese dependente <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Assim, a modulação da atividade dos materiais estudados em áreas doentes por direcionamento magnético pode ser uma excelente ferramenta para melhorar condições patofisiológicas envolvendo vasculatização.
21	Krismastuti et al. (2017)	Artigo	Projetar e testar biossensores fotônicos para a detecção seletiva de tipo de diferentes metaloproteínas de matriz (MMPs).	Nanopartículas magnéticas ligadas a anticorpos; Nanopartículas Magnéticas com Terminação de Ácido Carboxílico (imuno-magnNPs).	Capacidade de detecção de diferentes tipos de MMPs corrobora com o prognóstico da cicatrização de feridas.	Os autores demonstraram com sucesso a prova de princípio para o biossensor seletivo de tipo para dois tipos diferentes de MMPs via imuno-magnNPs e transdutores pSIRM funcionalizados com peptídeos fluorogênicos. Relatam que essa plataforma multiparamétrica de detecção é adequada para desenvolvimento adicional como uma ferramenta de diagnóstico para a avaliação de feridas crônicas.
41	Bunea et al. (2017)	Artigo	Sintetizar, caracterizar um biomaterial de fibra-magnética de seda para cicatrização de feridas, além de avaliar seu comportamento biológico <i>in vitro</i> .	Biomaterial de fibra de seda com nanopartículas de Fe_3O_4 .	Dentre outras aplicações, pode ser utilizado na cicatrização de feridas.	Os autores relatam que o biomaterial possui boa biocompatibilidade dos filmes compostos em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASCs). Esses materiais biocompostos podem ser utilizados para aplicações de cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos.

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
49	Meng et al. (2018)	Revisão	Esta revisão tem o objetivo de apresentar informações sobre novas tecnologias para cicatrização de feridas baseadas em microRNA (miRNA).	miRNA conjugado com nanopartículas magnéticas (Anti-miRNA).	Terapia para a cicatrização de feridas.	Os autores relatam que o microambiente úmido e protegido, além da entrega eficaz do miRNA, é posto-chave da terapêutica. Além disso, diversos sistemas de entrega não viral para administração de miRNA foram desenvolvidos e comprovadamente eficazes, incluindo lipossomas, polímeros catiônicos, nanopartículas e até mesmo materiais inorgânicos. Assim, prevê-se que o miRNA tenha o potencial de se tornar a nova geração de terapêuticas de ácido nucleico para tratamento e manejo de cicatrização de feridas, juntamente com o desenvolvimento bem-sucedido de sistemas de entrega seguros e eficientes.
44	Moniri et al. (2018)	Artigo	O objetivo deste estudo foi preparar filmes de nanocelulose com nanocompositos magnética/bacteriana como curativo ecoamigável.	Filmes de nanocompositos de nanocelulose magnética / bacteriana (Fe ₃ O ₄ / BNC).	Podem ser usadas como um curativo eficaz para tratamento de feridas cutâneas.	Os autores informam que a síntese <i>in situ</i> e a deposição de NPs de Fe ₃ O ₄ em membranas fibrosas de BNC foram desenvolvidas com sucesso por meio de uma abordagem verde. Além disso, obtiveram resultados promissores com o uso da membrana de nanocomposito BNC/Fe ₃ O ₄ como um curativo antibacteriano e biocompatibilidade desejáveis para a cicatrização de feridas.

Fonte: elaborada pelos autores.

Nanopartículas lipídicas

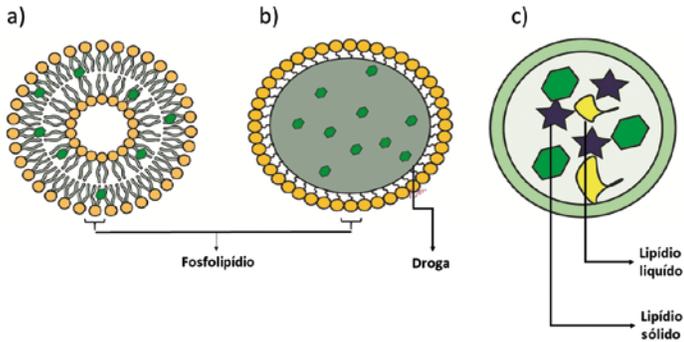
Dentre as diversas classes de nanocarreadores lipídicos desenvolvidas para a entrega de drogas, existem as nanopartículas à base de lipídios (LNPs) e nanoformulações compostas de lipídios e surfactantes biocompatíveis. Estas podem conter fármacos encapsulados em um núcleo lipídico ou adsorvidos na superfície da nanopartícula ⁵¹. Esses sistemas de liberação têm sido amplamente utilizados em aplicações biomédicas para transporte e liberação de fármacos ^{52,53} e ácidos nucleicos ⁵⁴ devido à sua biocompatibilidade, biodegradabilidade, baixa toxicidade e versatilidade ⁴, além de permitir liberação controlada e proporcionar melhor estabilidade química às moléculas ⁵⁵.

Os lipossomas foram as primeiras LNPs a surgir, em 1965. Outros exemplos de LNPs são as nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs) e portadores lipídicos nanoestruturados (NLCs) (**Figura 9**) ⁵¹, diferindo entre si em termos de hidrofílica / lipofilicidade e peso molecular, sendo os lipossomas o sistema com maior versatilidade, pois possibilita o encapsulamento de moléculas lipofílicas e hidrofílicas, independentemente do peso molecular ⁴. A seguir, é apresentado cada exemplo de LNPs.

Devido às grandes vantagens das LNPs, atenção crescente está sendo dada a esses nanocarreadores em diversas áreas, como cosméticos, alimentos, nutracêuticos e farmacêuticos ⁵⁶, além de possuir potenciais aplicações para cicatrização de feridas ^{29,57,58}.

Atualmente, LNPs têm sido utilizadas para diversos tratamentos na pele. Por exemplo, LNPs atuaram de forma promissora como agentes terapêuticos tópicos no tratamento de queimaduras em associação com RNAi ⁵⁹, além de serem eficientemente utilizadas para o encapsulamento de drogas ⁶⁰ e de compostos naturais ^{29,61,62} para a cicatrização de feridas.

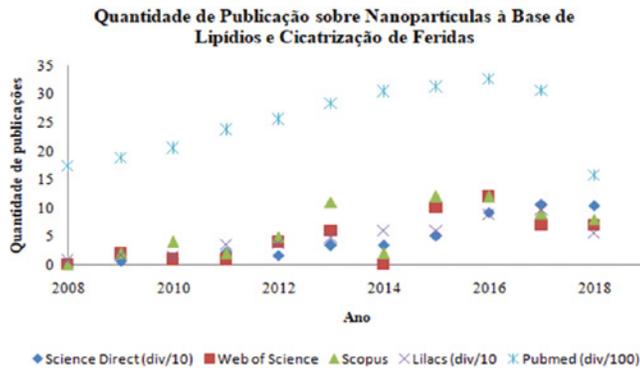
Figura 9: Representação esquemática de nanopartículas lipídicas. (a) Lipossomas; (b) Nanopartículas lipídicas sólidas; (c) Portadores lipídicos nanoestruturados



Fonte: adaptada de Zhang & Zhang (2013) ⁵¹.

Pesquisas sobre o uso de nanopartículas à base de lipídios relacionadas à cicatrização de feridas têm aumentado progressivamente nos últimos dez anos, como é mostrado na **Figura 10**.

Figura 10: Quantidade de publicações sobre nanopartículas lipídicas e cicatrização de feridas nos últimos dez anos



Fontes: Science Direct, Web of Science, Scopus, Lilacs e Pubmed/ Medline. Elaborada pelos autores. Acesso em 9 de agosto de 2018.

Lipossomas

Os lipossomas são os nanocarreadores lipídicos que apresentam a maior versatilidade devido à possibilidade de encapsular moléculas lipofílicas e hidrofílicas, independentemente do peso molecular ⁴.

Os fosfolipídios em soluções aquosas podem formar estruturas fechadas em bicamadas, o que permitiu que a pesquisa sobre os lipossomas percorresse um longo caminho, convertendo-os de simples objetos de pesquisa biofísica em carreadores terapêuticos para numerosas aplicações clínicas ⁶³.

Lipossomas são definidos como vesículas esféricas fechadas que possuem uma cavidade interna aquosa cercada de uma ou mais bicamadas lipídicas **Figura 9**. Essa estrutura permite-lhes transportar compostos hidrofóbicos e hidrofílicos sem modificação química. Seu núcleo aquoso permite a encapsulação de drogas solúveis em água, enquanto que moléculas hidrofóbicas podem ser absorvidas na bicamada ^{51,64}.

A bicamada lipídica dos lipossomas permite a liberação controlada do conteúdo presente em seu núcleo devido à possibilidade de fusão da bicamada lipídica com outras camadas, como a membrana celular ⁶⁴.

Lipossomas demonstraram potencial para aplicação tópica na cicatrização de feridas. Colírios lisossômicos baseados em verbascosídeos foram utilizados para tratar feridas corneanas alcalinas em lebres. A administração tópica de verbascosídeo mostrou reduzir o tempo de ação das células, em que o tempo de cicatrização do epitélio da córnea foi de apenas 48 horas ³⁸. Uma formulação lipossomal da proteína Wnt3a aplicada topicamente para tratar feridas na pele aumentou a sinalização endógena de Wnt e resultou em melhor cicatrização da ferida da pele, indicando que o Wnt3a lipossômico pode ter aplicação generalizada na prática clínica. Para promover a cicatrização de feridas diabéticas murinas humanizadas, lipossomas foram utilizados para realizar a administração tópica de siRNA direcionado contra o Keap1 e mostraram acelerar a regeneração do tecido diabético e aumentar a homeostase de redução-oxidação no ambiente da ferida ⁶⁵.

Recentemente, hidrogéis contendo lipossomas carregados de quercetina⁶⁶ e com ácido ricinoleico⁶⁷ foram utilizados para promover aceleração da cicatrização de feridas em estudos *in vivo*.

Em outro estudo, os lipossomas foram utilizados para transportar fator de crescimento epidérmico (EGF), a fim de promover reparo ósseo, e apresentaram potencial para administrar fatores de crescimento de maneira controlada, estimulando a migração de células mesenquimais e a diferenciação osteoblástica na cicatrização óssea⁶⁸.

Nanopartículas lipídicas sólidas (SLNs)

As SLNs surgiram desde 1990 como um sistema de transporte substituto para lipossomas, emulsões e nanopartículas poliméricas⁵¹. São LNPs que apresentam formato esférico com tamanho médio de 40 nm a 1.000 nm, compostas por lipídios em fase sólida, à temperatura corporal e ambiente, mais surfactante. SLNs proporcionam estabilidade ao fármaco e liberação prolongada quando comparadas com lipossomas, e são mais seguras que os portadores poliméricos por não possuírem solventes orgânicos^{64,69}. Essas LNPs apresentaram bom potencial na indústria de cosméticos e alimentos⁶⁹ e para cicatrização de feridas⁵⁷.

SLN modificada com material de própolis forneceu uma aceleração do processo de cicatrização de feridas *in vivo*, representando um sistema tópico de liberação de própolis para o tratamento de feridas. Essas LNPs também foram testadas, a fim de promover o fornecimento sustentado e controlado de LL37 e A1 para melhorar a cicatrização de feridas e aumentar sinergicamente a atividade antibacteriana *in vitro*. Os resultados mostraram cicatrização acelerada de feridas, além de aumentar a atividade antibacteriana contra *S. aureus* e *e. coli*⁷⁰.

Hidrogel contendo SLNs (SLN-gel) foi preparado para a administração tópica de astragaloside IV. A formulação aumentou a migração e a proliferação de queratinócitos, e a captação de fármacos em fibroblastos *in vitro*, fortalecendo a cicatrização de feridas e inibindo a formação de cicatriz *in vivo*, aumentando a taxa de fechamento da ferida e contribuindo para a angiogênese e organização regular do colágeno⁵⁷.

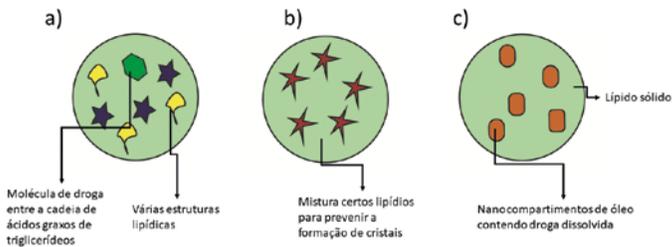
Portadores lipídicos nanoestruturados (NLCs)

Os NLCs surgiram no final dos anos 90 para dominar as possíveis limitações das SLNs ⁶⁹, em que o núcleo lipídico sólido foi transformado em uma nanoestrutura menos organizada, no qual a fase lipídica contém lipídios sólidos (gordurosos) e líquidos (óleo) à temperatura ambiente. Surgiram a fim de melhorar a estabilidade, capacidade de carga e liberação de drogas durante o armazenamento destes ^{69,71}.

Devido à sua matriz lipídica extremamente desordenada, encapsulamento e estabilidade melhorados da droga e bom perfil de liberação, os NLCs tornaram-se populares no campo de pesquisa nanofarmacêutica ⁶⁹.

O aumento da capacidade de carga de fármaco e a diminuição da expulsão do fármaco durante o armazenamento são obtidos por meio dos lipídios líquidos, pois estes podem romper a estrutura de rede cristalina das SLNs e aumentar o número de imperfeições na matriz durante o armazenamento em comparação com as SLNs. Além disso, o perfil de liberação do fármaco pode ser controlado variando a composição e a quantidade do lipídio ⁵¹. Na **Figura 11**, são representadas três estruturas de NLCs.

Figura 11: Estruturas de portadores lipídicos nanoestruturados (NLC).
(a) Classe I (tipo imperfeito); (b) classe II (tipo sem forma) e (c) classe III (tipo múltiplo)



Fonte: adaptada de Zhang & Zhang (2013) ⁵⁰.

A primeira classe, do tipo imperfeito, possui gorduras sólidas e líquidas (óleo) misturadas em várias estruturas lipídicas. A estrutura de matriz lipídica imperfeita apresenta lacuna entre as cadeias de ácidos graxos triglicerídeos no cristal, aumentando a capacidade de as drogas de entrarem na matriz. A segunda classe é do tipo sem forma (matriz não cristalina). Esta não possui estrutura cristalina, o que evita a expulsão do fármaco carregado. Nessa forma, os cristais são formados durante o resfriamento. A terceira classe é do tipo múltipla, em que a solubilidade do fármaco no lipídio líquido é maior do que no lipídio sólido. Os NLCs são produzidos por diferentes métodos avançados e sua preparação é possível e praticável em laboratório e em larga escala ⁶⁹.

NLCs foram utilizados para encapsular timol, composto natural promissor para a cicatrização de feridas, e depois incorporados em um gel. A formulação foi testada em ratos com psoríase e mostrou melhor cicatrização em comparação com o controle negativo ²⁹.

Em estudos *in vitro*, gel de hialuronato baseado em nanopartículas (NLCs e SLNs) contendo palmitato de retinol apresentou diferenças significativas em áreas de feridas entre as células tratadas e de controle durante as primeiras 24 horas após o ferimento, sugerindo que esse composto poderia ser eficientemente usado para a cicatrização de feridas ⁷².

SLNs e NLCs foram utilizados para carrear óleo de oliva e óleo de eucalipto, e, além de apresentar propriedades físico-químicas adequadas, mostraram boa bioadesão, citocompatibilidade, realce proliferativo *in vitro* e propriedades de cicatrização de feridas para fibroblastos, associadas a propriedades antimicrobianas. Além disso, evidenciaram capacidade de melhorar o processo de cicatrização *in vivo* ⁶¹.

LNPs, além de todas as vantagens e possibilidades citadas, possuem grande versatilidade em relação às vias de administração, podendo ser utilizadas por (1) via tópica suprimindo uma das principais limitações para o tratamento de pele, que é a baixa eficácia do medicamento devido à deficiente penetração de drogas na pele; (2) via oral, que é

o sistema de administração de medicamentos mais comum; (3) via ocular, pois são sistemas de liberação de drogas capazes de passar a barreira ocular sanguínea, obter liberação sustentada e controlada de drogas, proteger drogas de enzimas lacrimais e prolongar a deposição de drogas e o tempo de permanência nos olhos; (4) via parental, uma vez que LNPs carregadas com drogas podem ser injetadas por via intravenosa, subcutânea, intramuscular e diretamente nos órgãos-alvo; (5) entrega pulmonar, uma via não invasiva de administração de drogas para administração local e sistêmica e (6) entrega cerebral, visto que as LNPs aumentam o tempo de retenção de drogas no sangue dos capilares cerebrais e induzem um gradiente de fármaco do sangue para os tecidos cerebrais, abrindo junções estreitas para facilitar a passagem da barreira hematoencefálica ⁷³. Assim, o uso de LNPs resulta em diversas possibilidades e potenciais para aplicações biomédicas, especialmente para cicatrização de feridas e regeneração tecidual.

Selecionaram-se 14 artigos com informações sobre o tema proposto, e, para melhor apresentação, os dados foram dispostos em uma tabela (**Tabela 3**) contendo os seguintes itens: Autores, Tipo de Estudo, Objetivo (s) do trabalho, Nanopartículas à base de lipídios citadas, potenciais aplicações e Resultados obtidos pelo trabalho.

Tabela 3. Alguns trabalhos contendo informações sobre materiais contendo nanopartículas/nanoestruturas à base de lipídios aplicadas no tratamento de feridas e regeneração tecidual

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
38	Bayer et al. (2011)	Artigo	Demonstrar uma técnica simples e eficiente com propriedades multifuncionais em redes de fibras de celulose, com soluções de monômero de etil-cianoacrilato contendo partículas submicrométricas orgânicas suspensas ou nanopartículas inorgânicas.	Nanopartículas de MnFe ₂ O ₄ .	Folhas de celulose antimicrobiana podem ser usadas como curativo em medicina.	Demonstram uma técnica de baixo custo, escalável, e processo verde capaz de tornar qualquer tipo de material celulósico fibroso multifuncional. Características como: responsividade magnética, atividade antibacteriana, entre outras, foram alcançadas.
39	Brandelli (2012)	Revisão	O presente trabalho discute as possíveis aplicações de nanopartículas no transporte e na entrega de peptídeos antimicrobianos.	Nanopartículas de níquel; Nanopartículas de óxido de ferro.	Nanopartículas de níquel magnético uniformemente revestidas com biofilme de nanocamada de ácido poliacrílico podem ser utilizadas para imobilização de peptídeo antimicrobiano; as nanopartículas magnéticas de óxido de ferro podem ser utilizadas revestido-as com vários polímeros.	O autor conclui que peptídeos antimicrobianos incorporados a nanocarreadores podem controlar a presença de bactérias patogênicas, melhorando também a estabilidade, eficácia e sua entrega nos tecidos.
43	Kim et al. (2013)	Artigo	Desenvolver e validar uma plataforma de termoterapia com nanopartícula magnética antimicrobiana (NSPMA) que poderia especificamente visar e matar bactérias em um modelo de cultura <i>in vitro</i> do biofilme de <i>S. aureus</i> e em um modelo de rato de infecção cutânea por <i>S. aureus</i> .	Nanopartículas de Fe ₃ O ₄ .	NSPMAanti- <i>Staphylococcus aureus</i> NSPMAanti-IgG como agentes antimicrobianos resultando em melhoria da cicatrização de feridas.	Foi desenvolvida uma plataforma de termoterapia antimicrobiana magnética utilizando NSPMA direcionadas a anticorpos e campo magnético alternado (CMAs) de alta frequência e alta amplitude, e foi validada sua eficácia na rápida depuração de patógenos de <i>S. aureus in vitro</i> e <i>in vivo</i> em um modelo de rato com infecção da ferida cutânea.

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
33	Yallapu et al. (2015)	Revisão	Este trabalho pretende fornecer uma visão geral de uma eficiente nanoformulação de curcumina como opção terapêutica direcionada para diversas doenças humanas. Discutem-se as evidências clínicas, o status atual e as oportunidades futuras de nanoformulação (s) de curcumina (s) no campo da medicina.	Curcumina encapsulada com nanopartículas magnéticas.	Nanopartículas magnéticas de curcumina podem aumentar a temperatura sob um campo magnético externo e promover atividade antimicrobiana.	Os autores mostram publicações que relatam sistemas comumente usados para fornecer curcumina com uso de nanopartículas magnéticas, as quais podem ser usadas para fins multifuncionais, incluindo a administração de drogas (curcumina), RM e hipertermia.
42	Cornell et al. (2016)	Artigo	O trabalho avaliou a biocompatibilidade de SPIONPs em CEC bovinos. Especificamente, a viabilidade e estrutura do citoesqueleto de CECs expostos a SPIONPs na presença de uma força magnética.	Nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticos (SPIONPs) conjugadas com células endoteliais.	Usar nanopartículas de óxido de ferro superparamagnéticos (SPIONPs) como guias para células endoteliais da córnea (CECs) às áreas lesadas através de força magnética externa sem alterar sua morfologia ou viabilidade.	Os autores observaram que a exposição de nanopartículas aos CECs teve impacto mínimo na viabilidade e estrutura das células. Verificou-se que a exposição magnética inicial teve um efeito benéfico na viabilidade, o que ajudaria no reparo celular e seria uma interessante alternativa a procedimentos cirúrgicos.
40	Brett et al. (2017)	Artigo	O presente estudo analisou os efeitos da regulação positiva de Bcl-2 mediada por minicirculo usando magnetofecção na diferenciação osteogénica e um novo perfil pré-fabricado para transfectar células estromais derivadas de tecido adiposo (CTA) após implantação de um modo temporoespacialmente controlado para estimular a regeneração óssea.	Núcleos de óxido de ferro revestidos sequencialmente com polietilenoimina ramificada, plasma minicirculo codificador de proteína verde fluorescente e Bcl-2 e poli-b-aminóéster.	Direcionamento ao local-alvo e aumento da velocidade de regeneração óssea e da cicatrização de feridas.	Os autores mostraram que, por meio de transfecção assistida magnética de um minicirculo que expressa Bcl-2, aumentaram a expressão do gene de interesse, a proliferação celular e a redução dos marcadores de apoptose comparados com CTA-nucleofecção. Além disso, o novo perfil pré-fabricado ligado à Npmg permite o controle temporoespacial <i>in situ</i> pós-implante da transfecção celular para amplificar a regeneração óssea.

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
48	Hao et al. (2017)	Artigo	Investigar se as funções dos macrofagos relacionados à regeneração do tecido ósseo podem ser moduladas empregando uma estrutura superparamagnética após a magnetização e para esclarecer os mecanismos subjacentes.	Nanofibras contendo nanopartículas de $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ hidroxapatita.	Regeneração de tecido ósseo.	Houve inibição da secreção das citocinas pró-inflamatórias IL-1 β , TNF- α e MCP-1, bem como as citocinas de diferenciação de osteoclastos MMP-9 e TRAP, e up-regulando VEGF e PDGF. Os meios condicionados estimularam a osteogênese dos osteoblastos e a angiogênese das células endoteliais.
50	Heun et al. (2017)	Artigo	Desenvolver uma técnica de transferência de genes baseada no direcionamento magnético de complexos de nanopartículas-lentivírus magnéticos (NPMg-LV), permitindo a entrega de genes em locais para feridas na pele dorsal de ratos.	Complexos de nanopartículas-lentivírus magnéticos (NPMg-LV).	Influência positiva na angiogênese de tecidos.	Os autores relataram que não apenas alcançaram a expressão gênica diferencial desejada em sítios definidos do mesmo tecido usando o direcionamento magnético de partículas magnéticas e lentivirais, mas também informam um papel decisivo na hiperigria e angiogênese dependente <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> . Assim, a modulação da atividade dos materiais estudados em áreas doentes por direcionamento magnético pode ser uma excelente ferramenta para melhorar condições patofisiológicas envolvendo vascularização.
21	Krisnastuti et al. (2017)	Artigo	Projetar e testar biossensores fotônicos para a detecção seletiva de tipo de diferentes de metaloproteínas de matriz (MMPs).	Nanopartículas magnéticas ligadas a anticorpos: Nanopartículas Magnéticas com Terminação de Ácido Carboxílico (imuno-magnNPs).	Capacidade de detecção de diferentes tipos de MMPs corrobora com o prognóstico da cicatrização de feridas.	Os autores demonstraram com sucesso a prova de princípio para o biossensor seletivo de tipo para dois tipos diferentes de MMPs via imuno-magnNPs e transdutores pSIRM funcionalizados com peptídeos fluorogênicos. Relatam que essa plataforma multiparamétrica de detecção é adequada para desenvolvimento adicional como uma ferramenta de diagnóstico para a avaliação de feridas crônicas.
41	Bunea et al. (2017)	Artigo	Sintetizar, caracterizar um biomaterial de fibraína-magnética de seda para cicatrização de feridas, além de avaliar seu comportamento biológico <i>in vitro</i> .	Biomaterial de fibraína de seda com nanopartículas de Fe_3O_4 .	Dentre outras aplicações, pode ser utilizado na cicatrização de feridas.	Os autores relatam que o biomaterial possui boa biocompatibilidade dos filmes compostos em células-tronco derivadas de tecido adiposo humano (hASCs). Esses materiais biocompostos podem ser utilizados para aplicações de cicatrização de feridas e na engenharia de tecidos.

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas/ Nanoestruturas magnéticas citadas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
49	Meng et al. (2018)	Revisão	Esta revisão tem o objetivo de apresentar informações sobre novas tecnologias para cicatrização de feridas baseadas em microRNA (miRNA).	miRNA conjugado com nanopartículas magnéticas (Anti-miRNA).	Terapia para a cicatrização de feridas.	Os autores relatam que o microambiente úmido e protegido, além da entrega eficaz do miRNA, é posto-chave da terapêutica. Além disso, diversos sistemas de entrega não viral para administração de miRNA foram desenvolvidos e comprovadamente eficazes, incluindo lipossomas, polímeros catiônicos, nanopartículas e até mesmo materiais inorgânicos. Assim, prevê-se que o miRNA tenha o potencial de se tornar a nova geração de terapêuticas de ácido nucleico para tratamento e manejo de cicatrização de feridas, juntamente com o desenvolvimento bem-sucedido de sistemas de entrega seguros e eficientes.
44	Moniri et al. (2018)	Artigo	O objetivo deste estudo foi preparar filmes de nanocelulose com nanocompósitos magnética/bacteriana como curativo ecoamigável.	Filmes de nanocompósitos de nanocelulose magnética / bacteriana (Fe ₃ O ₄ / BNC).	Podem ser usadas como um curativo eficaz para tratamento de feridas cutâneas.	Os autores informam que a síntese <i>in situ</i> e a deposição de NPs de Fe ₃ O ₄ membranas fibrosas de BNC foram desenvolvidas com sucesso por meio de uma abordagem verde. Além disso, obtiveram resultados promissores com o uso da membrana de nanocompósito BNC/Fe ₃ O ₄ como um curativo antibacteriano e biocompatibilidade desejáveis para a cicatrização de feridas.

Fonte: elaborada pelos autores.

Nanopartículas poliméricas

As nanopartículas poliméricas são sistemas carreadores de fármacos e incluem nanocápsulas e nanoesferas, as quais diferem entre si segundo a composição e a organização estrutural. Em relação às nanocápsulas, o fármaco pode estar dissolvido e/ou adsorvido à parede polimérica. Já as nanoesferas não apresentam óleo em sua composição, elas são formadas por uma matriz polimérica onde o fármaco pode ficar retido ou adsorvido ⁷⁶.

O uso de polímeros biodegradáveis na produção de nanopartículas é uma aplicação consolidada na área médica e farmacêutica. Por exemplo, na preparação de nanoesferas e nanocápsulas, é possível a incorporação de princípios ativos, hidrofílicos ou hidrofóbicos. Essa abordagem é uma opção para aplicações de liberação controlada e direcionamento específico de fármacos. Com isso, promove proteção do princípio ativo, melhor biodisponibilidade e menor toxicidade. Essas características proporcionam maior conforto e adesão dos pacientes ao tratamento ⁷⁷.

Nanopartículas poliméricas têm atributos favoráveis, em termos de simples elaboração e desenho, e boa estabilidade química e biocompatibilidade^{77,78}. Além disso, nanopartículas poliméricas não induzem resposta imunogênica e são atóxicas e biodegradáveis ⁷⁹.

Esses sistemas têm sido desenvolvidos visando a inúmeras aplicações terapêuticas e podem ser administrados pelas vias parenteral, oral ou oftálmica. Uma das áreas mais promissoras na utilização das nanopartículas é a vetorização de fármacos e de antibióticos, principalmente por meio de administração parenteral, almejando uma distribuição mais seletiva destes e, assim, um aumento do índice terapêutico. Algumas das vantagens relacionadas à vetorização de fármacos consistem na redução dos seus efeitos adversos e no aumento da sua biodisponibilidade, em relação ao uso do fármaco em sua apresentação tradicional, ou seja, sem uso de nanoestrutura ⁷⁹.

Os polímeros biodegradáveis empregados na produção de nanopartículas poliméricas, por polimerização de monômeros, são copolímeros do ácido metacrílico e de éster acrílico ou metacrílico ⁸⁰. Algumas características relacionadas à composição dos polímeros e princípios ativos influenciam na sua biodisponibilidade, isto é, como: hidrofobicidade, carga superficial, perfil de degradação, massa molar e carga elétrica ⁸¹. A degradação polimérica depende também do comprimento da cadeia alquil do polímero utilizado. Algumas vantagens desse sistema nanoestruturado são: promover a liberação do princípio ativo gradativamente; e promover direcionamento específico por um período de dias ou semanas, no caso da forma farmacêutica endovenosa ⁷⁷.

Os principais exemplos de polímeros pré-formados são: a poli(ϵ -caprolactona), o PLA, o poli(glicolídeo) (PLGA) ou PLA-co- PLGA. Por outro lado, como exemplos de monômeros para polimerização *in situ*, destacam-se os derivados de cianoacrilato de alquila. O fármaco pode encontrar-se dissolvido, retido ou adsorvido na matriz polimérica, ou ainda, no caso de nanocápsulas, no núcleo oleoso ⁷⁹. Entre os polímeros naturais, a albumina apresenta características exclusivas que a tornam um ótimo veículo para entrega de fármacos. Essa proteína é um transportador natural de moléculas hidrofóbicas, tais como vitaminas, hormônios e outros constituintes do plasma. A ligação de substâncias hidrofóbicas à albumina é reversível e permite o transporte de fármacos até a superfície das células. Além disso, a albumina facilita a transcitose endotelial dos constituintes acoplados à albumina para o espaço extravascular ⁸².

Em um estudo de Hussain et al. (2013)⁸³ sobre nanopartículas de quitosana cocarregadas com hidrocortisona e hidroxitirosol no tratamento de dermatite atópica, demonstrou-se que o hidroxitirosol diminuiu os efeitos adversos da hidrocortisona, promoveu maior efeito anti-inflamatório e acúmulo epidérmico e dérmico da nanoformulação em comparação a uma formulação comercial de hidrocortisona.

Entre os vários polímeros disponíveis, o poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) é o polímero usado principalmente em sistemas de entrega de drogas para uma variedade dessas substâncias, devido à sua excelente biocompatibilidade e biodegradabilidade. A utilização das nanopartículas de PLGA também resultou em várias vantagens sobre a distribuição convencional de fármaco, como: melhoria da estabilidade do fármaco na matriz polimérica; maior capacidade de transporte de drogas e liberação sustentada; redução da dose e frequência de dosagem; além da redução de efeitos sistêmicos ⁸⁴ .

No estudo de Ali et al. (2016)⁸⁵, foi desenvolvido um curativo contendo nanopartículas em nanofibras eletrofiadas (NPs-in-NFs) de quitosana aprimorada (CS) / poli (óxido de etileno) (PEO) incorporando Fenitoína (Ph), um antiepilético. Foi descrito que esse tipo de curativo exibiu várias vantagens, por exemplo, alta biodegradabilidade, biocompatibilidade, porosidade e permeabilidade. Além disso, observou-se que esse material levou à maior viabilidade celular com aumento da proliferação na epiderme e formação de granulação, com mínima formação de tecidos necróticos e inflamatórios e sem hemorragia ⁸⁵. Essas características mostram que esses materiais podem ser considerados promissores como curativos para feridas.

Sistemas de administração de fármacos baseados em Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) apresentam excelente aplicabilidade para utilização em curativos, visto que são úteis como carreadores de agentes terapêuticos e como promotores da cicatrização de feridas. PLGA pode aumentar a eficácia dos tratamentos de feridas, liberando o agente terapêutico a uma taxa controlada e sustentada. Foi avaliada a aplicação terapêutica de PLGA, via mecanismo de lactato, e houve um efeito positivo no processo de cicatrização de feridas ⁸⁶.

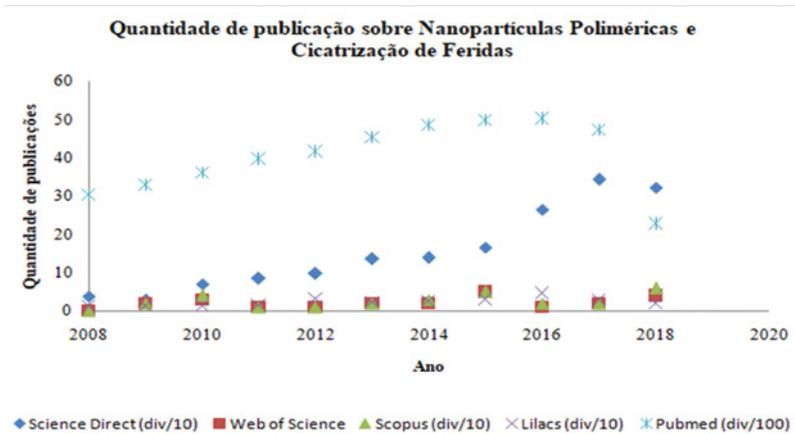
Ainda foi demonstrado que o Poli (ácido láctico-co-glicólico) (PLGA) pode ser utilizado para acelerar a neovascularização e a cicatrização de feridas, visto que pode ser usado para liberação de agentes cicatrizantes, como fator de crescimento endotelial vascular (VEGF).

A administração de VEGF, encapsulado em nanopartículas de PLGA (PLGA -VEGF NP), promoveu rápida cicatrização tecidual, maior re-epitelização, formação de tecido de granulação e angiogênese. Ainda foi demonstrado que PLGA-VEGF NP induziu o aumento da proliferação e migração de queratinócitos, e regulou positivamente a expressão de VEGFR2 ⁸⁷.

O uso de nanopartículas contendo óxido nítrico (NO) também pode ser uma excelente alternativa como potencializador de cicatrização e como agente antibacteriano, o qual tem potencial para contornar a resistência aos antibióticos em feridas. No entanto, a liberação de NO durante longos períodos ainda é inadequada para aplicação clínica ⁸⁸.

Na **Figura 12**, são mostradas publicações feitas nos últimos 10 anos sobre nanopartículas poliméricas usadas para cura de feridas e cicatrização.

Figura 12: Quantidade de publicações sobre nanopartículas poliméricas e cicatrização de feridas



Fontes: Science Direct, Web of Science, Scopus, Lilacs e Pubmed/Medline.

Elaborada pelos autores. Acesso em 2 de agosto de 2018.

Apesar das notáveis características citadas anteriormente, o uso de polímeros é geralmente limitado por suas propriedades mecânicas. Eles são combinados com polímeros sintéticos, a fim de melhorar as suas propriedades mecânicas e são adaptados para modificar o seu padrão de degradação. Alguns problemas comuns relacionados ao sucesso de curativos de feridas incluem: incapacidade de manter um ambiente úmido, pouca absorção de exsudatos da ferida, dificuldade na remoção do curativo após a cicatrização, reações não alérgicas e pouca proteção contra infecção bacteriana. Isso leva a um processo de cicatrização de feridas retardado, isto é, a uma síntese de tecido conjuntivo, migração epidérmica e angiogênese atrasada, e à pobre troca gasosa entre a ferida e o meio ambiente. O alginato representa um biopolímero que pode superar os problemas nos curativos de ferida, visto que é um material com potencial para aumentar a absorção do exsudato da ferida e minimizar as infecções bacterianas, reduzir os efeitos alérgicos adversos, além de exibir propriedades hemostáticas, que são úteis para feridas sangrantes ⁸⁹.

As propriedades multifuncionais e farmacológicas de polifenóis, oriundos do chá-verde, como anti-inflamatória, vasodilatadora, antioxidante e antimicrobiana, têm atraído a atenção dos cientistas nos últimos anos. Os produtos de degradação dos taninos polifenóis do chá resultam em catecol molecular e ácido gálico, ambos fortes reticuladores, que se ligam às superfícies dos tecidos por meio de ligações covalentes e interações não covalentes, e podem atuar como um músculo adesivo com alta elasticidade. Foi desenvolvido um hidrogel, rico em antioxidantes do chá-verde, o qual aumentou significativamente a cicatrização de feridas. Esse hidrogel pode ser usado como uma pomada ⁹⁰.

O alginato tem sido usado para encapsular o extrato obtido de plantas. Pereira e colaboradores (2013) ⁹¹ criaram um filme composto de alginato e gel de *Aloe vera*. Durante anos, o gel de *Aloe vera* tem sido conhecido por suas propriedades medicinais, dada sua grande fonte de polissacarídeos, como acemanano, manana, galactano, ácido glucurônico etc. Essas misturas de polissacarídeos resultam em propriedades

anti-inflamatórias e antibacterianas, as quais são úteis para regeneração tecidual. Nos últimos anos, têm sido desenvolvidos curativos baseados em *Aloe vera* em formulação de gel para facilitar o uso em áreas lesionadas, sendo o alginato e a quitosana os polímeros mais utilizados para a preparação dessas formulações ⁹¹.

A quitosana tem sido utilizada no desenvolvimento de variados sistemas poliméricos para aplicações médicas. É descrito que a presença do grupo amino na estrutura química da quitosana favorece sua propriedade antibacteriana e, com isso, esse polímero tem sido utilizado para encapsulamento de antibióticos, especialmente, para inibir a proliferação de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Um curativo à base de celulose contendo nanopartículas de quitosana e de prata foi desenvolvido e testado em cultura de células (fibroblastos e cepas de bactérias). O uso desse curativo promoveu efeito antibiótico contra *S. aureus* e *E. coli* e induziu a proliferação em fibroblastos. Assim, o uso desse curativo, como biomaterial, apresenta grande potencial para aplicação em feridas ⁹².

Em estudo de Zi-Wei et al. (2017)⁹³, foi relatado o uso de nanofibras compostas por nanopartículas de prata, quitosana e poli álcool vinílico (PVA) via técnica de eletrospinning. O estudo mostrou que as nanofibras promoveram a proliferação de fibroblastos, síntese de colágeno, adesão celular e expressão do fator transformador de crescimento (TGF- β 1).

Uma série de outros tipos de curativos, contendo biomateriais baseados em polímeros, tem sido relatada para aplicação em feridas como agentes antibióticos e anti-inflamatórios ^{94,96,97}. Assim, a **Tabela 3** abaixo exemplifica o uso de nanopartículas poliméricas aplicadas na cicatrização de feridas, em artigos publicados entre os anos de 2017 e 2018.

Tabela 4. Trabalhos com informações sobre materiais contendo nanopartículas poliméricas aplicadas à cicatrização de feridas

Número da Referência	Autores	Tipo de Estudo	Objetivo(s) do trabalho	Nanopartículas poliméricas	Potenciais aplicações	Resultados obtidos pelo trabalho
84	Varshosaz et al., (2017)	Artigo	O objetivo deste estudo foi desenvolver um gel de hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) / quitosana contendo micelas poliméricas carregadas com sinvastatina (Sim) e avaliar sua propriedade de cicatrização em ratos.	Micelas poliméricas.	Efeito na melhora significativa da cicatrização de feridas em comparação com a solução salina normal.	Os autores concluíram que micelas carregadas associadas ao gel de HPMC e quitosana podem representar uma nova formulação tópica para a cicatrização <i>in vitro</i> .
89	Aderighibee e Buyanat (2018)	Artigo de Revisão	Esta revisão fornece uma visão abrangente das diferentes formas de curativos de feridas contendo resultados de alginato, <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Nanopartículas poliméricas de alginato.	As propriedades aumentam a rápida re-epitelização, a formação de tecido de granulação e a cicatrização de feridas.	A adição de agentes bioativos aos hidrogéis também aprimorou o processo de cicatrização de feridas. As propriedades mecânicas dos hidrogéis foram aprimoradas combinando alginato de sódio com polímeros sintéticos ou usando plastificantes de infecções bacterianas.
90	Mahata (2018)	Artigo	Os autores descrevem o desenvolvimento de microcápsulas porosas automatizadas de um hidrogel coloidal de polifenóis de taninos de chá para entrega de medicamentos.	Nanopolímeros de polifenóis de taninos.	As propriedades multifuncionais dos polifenóis do chá são como anti-inflamatórios e cicatrizantes.	A vantagem mais importante é que pode ser usado como uma pomada. O gel aumentou significativamente a atividade de cicatrização de feridas, o hidrogel desenvolvido demonstrou um potencial agente de tratamento de feridas.
96	Chabala et al., (2017)	Artigo de Revisão	Neste trabalho, foi proposto o desenvolvimento de uma associação sinérgica com <i>Aloe vera</i> , quitosana, alginato com nanopartículas de prata, a fim de obter um curativo ativo com atividade antimicrobiana e entrega controlada de <i>Aloe vera</i> e AgNps.	Nanopartículas de prata com <i>Aloe vera</i> , quitosana, alginato.	Os resultados mostram que alginato-quitosana com gel de <i>Aloe vera</i> (AV) e nanopartículas de prata (AgNps) exibem propriedades antibacterianas.	A sinergia entre alginato, quitosana, gel de <i>aloe vera</i> e o AgNps oferece uma alternativa promissora para ser usado em aplicações antibacterianas. Esse método alternativo pode ajudar a diminuir os efeitos de antibióticos que são comumente utilizados em tratamentos de feridas, com a vantagem de que as matrizes desenvolvidas promovem a cicatrização de feridas por meio de suas características químicas.
97	Bairagi et al., (2018)	Artigo	O objetivo do presente estudo foi desenvolver nanopartículas de ácido ferúlico e estudar suas atividades de hipoglicemia e cicatrização de feridas.	Nanopartículas de ácido ferúlico.	O ácido ferúlico é um composto fenólico e um antioxidante com uma extensa gama de efeitos terapêuticos, atividade anti-inflamatória, e neurogênico.	O presente estudo fornece uma visão sobre as características potenciais do ácido ferúlico em nanopartículas para entrega tópica. Método de precipitação nano foi com sucesso empregado para encapsulamento de ácido ferúlico em nanopartículas.

Fonte: elaborada pelos autores.

3. Considerações finais

Esforços no desenvolvimento de novos curativos com agentes bioativos têm um papel importante e muito mais eficaz no tratamento de feridas. A sinergia entre compostos bioativos oferece uma alternativa promissora para aplicações no processo de cicatrização de feridas, visto que esses compostos podem apresentar atividade antibacteriana, anti-inflamatória e pró-proliferativa.

Referências

1. Dwivedi, C., Pandey, H., C. Pandey, A., et al. "Nanofibre Based Smart Pharmaceutical Scaffolds for Wound Repair and Regenerations," **Current Pharmaceutical Design**, V. 22, No. 11, 2016, p. 1460–71.
2. Haidar, M., and Eroglu, H. "Nanofibers: New Insights for Drug Delivery and Tissue Engineering," **Current Topics in Medicinal Chemistry**, V. 17, No. 13, 2017, p. 1564–79.
3. Berthet, M., Gauthier, Y., Lacroix, C., et al. "Nanoparticle-Based Dressing: The Future of Wound Treatment?," **Trends in Biotechnology**, V. 35, No. 8, 2017, p. 770–84.
4. Campani, V., Giarra, S., and De Rosa, G. "Lipid-based core-shell nanoparticles: Evolution and potentialities in drug delivery," **Open-Nano**, V. 3, 2018, p. 5–17.
5. McLaughlin, S., Podrebarac, J., Ruel, M., et al. "Nano-Engineered Biomaterials for Tissue Regeneration: What Has Been Achieved So Far?," **Frontiers in Materials**, V. 3, 2016, p. 27.
6. Wang, E. C., and Wang, A. Z. "Nanoparticles and their applications in cell and molecular biology.," **Integrative biology : quantitative biosciences from nano to macro**, V. 6, No. 1, 2014, p. 9–26.
7. Mandelbaum, S. H., Di Santis, É. P., and Sant'Ana Mandelbaum, M. H. "Cicatrização: Current concepts and auxiliary resources - Part I," **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 2003.

8. Jeevanandam, J., Barhoum, A., Chan, Y. S., et al. "Review on nanoparticles and nanostructured materials: History, sources, toxicity and regulations," **Beilstein Journal of Nanotechnology**, V. 9, No. 1, 2018, p. 1050–74.
9. Walter, P., Welcomme, E., Hallégot, P., et al. "Early use of PbS nanotechnology for an ancient hair dyeing formula," *Nano Letters*, V. 6, No. 10, 2006, p. 2215–9.
10. Schaming, D., and Remita, H. "Nanotechnology: from the ancient time to nowadays," **Foundations of Chemistry**, V. 17, No. 3, 2015, p. 187–205.
11. Verità, M., and Santopadre, P. "Analysis of Gold-Colored Ruby Glass Tesserae in Roman Church Mosaics of the Fourth to 12th Centuries," **Journal of Glass studies**, V. 52, 2010, p. 11–24.
12. Lee, P. C., and Meisel, D. "Adsorption and surface-enhanced Raman of dyes on silver and gold sols," **Journal of Physical Chemistry**, V. 86, No. 17, 1982, p. 3391–5.
13. Luz, G. V. S., Santos, E. R., Cardoso, L. X., et al. "Optical and structural characteristics of ZnO nanopowders for different preparation methods," V. 8, No. 12, 2017, p. 1193–8.
14. Tanaka, H., Tan, I., Uenishi, M., et al. "The intelligent catalyst: Pd-perovskite having the self-regenerative function in a wide temperature range," v. vol. 317–318, 2006, 827–832 p.
15. Demir, B., Barlas, F. B., Guler, E., et al. "Gold nanoparticle loaded phytosomal systems: Synthesis, characterization and in vitro investigations," **RSC Advances**, V. 4, No. 65, 2014, p. 34687–95.
16. Anjana, J., Rajan, V. K., Biswas, R., et al. "Controlled delivery of bioactive molecules for the treatment of chronic wounds," **Current Pharmaceutical Design**, V. 23, No. 24, 2017, p. 3529–37.
17. Favi, P. M., Valencia, M. M., Elliott, P. R., et al. "Shape and surface chemistry effects on the cytotoxicity and cellular uptake of metallic nanorods and nanospheres," **Journal of Biomedical Materials Research - Part A**, V. 103, No. 12, 2015, p. 3940–55.

18. Rubina, M. S., Kamitov, E. E., Zubavichus, Y. V., et al. "Collagen-chitosan scaffold modified with Au and Ag nanoparticles: Synthesis and structure," **Applied Surface Science**, V. 366, 2016, p. 365–71.
19. Higa, L. H., Schilrreff, P., Perez, A. P., et al. "The intervention of nanotechnology against epithelial fungal diseases," **Journal of Biomaterials and Tissue Engineering**, V. 3, No. 1, 2013, p. 70–88.
20. Loomba, L., and Scarabelli, T. "Metallic nanoparticles and their medicinal potential. Part II: Aluminosilicates, nanobiomagnets, quantum dots and cochleates," **Therapeutic Delivery**, V. 4, No. 9, 2013, p. 1179–96.
21. Krismastuti, F. S. H., Dewi, M. R., Prieto-Simon, B., et al. "Disperse-and-Collect Approach for the Type-Selective Detection of Matrix Metalloproteinases in Porous Silicon Resonant Microcavities," **ACS SENSORS**, V. 2, No. 2, 2017, p. 203–9.
22. Nair, L. S., and Laurencin, C. T. "Silver nanoparticles: Synthesis and therapeutic applications," **Journal of Biomedical Nanotechnology**, V. 3, No. 4, 2007, p. 301–16.
23. Ulubayram, K., Calamak, S., Shahbazi, R., et al. "Nanofibers based antibacterial drug design, delivery and applications," **Current Pharmaceutical Design**, V. 21, No. 15, 2015, p. 1930–43.
24. Akhtar, M. S., Panwar, J., and Yun, Y. S. "Biogenic synthesis of metallic nanoparticles by plant extracts," **ACS Sustainable Chemistry and Engineering**, V. 1, No. 6, 2013, p. 591–602.
25. Silva, L. D. da. "Síntese verde, caracterização e atividade biológica de nanopartículas de prata obtidas utilizando extratos de *Hancornia speciosa* Gomes - Apocynaceae (mangabeira)." 2014.
26. Zarschler, K., Rocks, L., Licciardello, N., et al. "Ultras-small inorganic nanoparticles: State-of-the-art and perspectives for biomedical applications," **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, V. 12, No. 6, 2016, p. 1663–701.

27. CWTS Leiden Ranking. "CWTS Leiden Ranking 2014 - Methodology." CWTS Leiden Ranking. Available at: <http://www.leidenranking.com/>. Accessed August 14, 2018.
28. van Eck, N. J., and Waltman, L. "Software survey: VOSviewer, a computer program for bibliometric mapping," **Scientometrics**, V. 84, No. 2, 2010, p. 523–38.
29. Pivetta, T. P., Simões, S., Araújo, M. M., et al. "Development of nanoparticles from natural lipids for topical delivery of thymol: Investigation of its anti-inflammatory properties," **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, V. 164, 2018, p. 281–90.
30. Prestes, M. A., Ribas, C. A. P. M., Ribas Filho, J. M., et al. "Wound healing using ionic silver dressing and noncrystalline silver dressing in rats," **Acta Cirurgica Brasileira**, V. 27, No. 11, 2012, p. 761–7.
31. Silva, M., Aguiar, M., ... A. R.-R. da E., et al. "Utilização de nanopartículas no tratamento de feridas: Revisão sistemática," **SciELO Brasil**, n.d.
32. Vellayappan, M. V., Jaganathan, S. K., and Manikandan, A. "Nanomaterials as a game changer in the management and treatment of diabetic foot ulcers," **RSC Advances**, V. 6, No. 115, 2016, p. 114859–78.
33. Yallapu, M. M., Nagesh, P. K. B., Jaggi, M., et al. "Review Article Therapeutic Applications of Curcumin Nanoformulations," V. 17, No. 6, 2015.
34. Peterson, E. D. and C. "Unbounding the future-The Nanotechnology Revolution," 1991, p. 304.
35. Medrano, J. J. A. "Síntese e caracterização de nanopartículas de magnetita recobertas por bicamada de ácido oleico e óleo essencial (fe3o4@ao/oe) visando a aplicação no tratamento de úlceras gástricas." 2018.

36. Issa, B., Obaidat, I. M., Albiss, B. A., et al. "Magnetic nanoparticles: Surface effects and properties related to biomedicine applications," **International Journal of Molecular Sciences**, V. 14, No. 11, 2013, p. 21266–305.
37. Jurgons, R., Seliger, C., Hilpert, A., et al. "Drug loaded magnetic nanoparticles for cancer therapy," **iopscience.iop.org**, n.d.
38. Bayer, I. S., Fragouli, D., Attanasio, A., et al. "Water-repellent cellulose fiber networks with multifunctional properties," **ACS Applied Materials and Interfaces**, V. 3, No. 10, 2011, p. 4024–31.
39. Brandelli, A. "Nanostructures as promising tools for delivery of antimicrobial peptides," **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, V. 12, No. 8, 2012, p. 731–41.
40. BRETT, E., ZIELINS, E. R., LUAN, A., et al. "Magnetic Nanoparticle-Based Upregulation of B-Cell Lymphoma 2 Enhances Bone Regeneration," 2017, p. 1–10.
41. Bunea, M. C., Vasile, E., Galateanu, B., et al. "Silk fibroin films decorated with magnetic nanoparticles for wound healing applications," **Materiale Plastice**, V. 54, No. 1, 2017, p. 83–7.
42. Cornell, L. E., Wehmeyer, J. L., Johnson, A. J., et al. "Magnetic nanoparticles as a potential vehicle for corneal endothelium repair," **Military Medicine**, V. 181, No. 5, 2016, p. 232–9.
43. Kim, M.-H., Yamayoshi, I., Mathew, S., et al. "Magnetic Nanoparticle Targeted Hyperthermia of Cutaneous Staphylococcus aureus Infection," **Annals Of Biomedical Engineering**, V. 41, No. 3, 2013, p. 598–609.
44. Moniri, M., Boroumand Moghaddam, A., Azizi, S., et al. "Molecular study of wound healing after using biosynthesized BNC/Fe₃O₄ nanocomposites assisted with a bioinformatics approach," **International Journal of Nanomedicine**, V. Volume 13, 2018, p. 2955–71.

45. Berry, C. C., and Curtis, A. S. G. "Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine," **Journal of Physics D: Applied Physics**, V. 36, No. 13, 2003, p. R198–206.
46. Feng, X., Chen, A., Zhang, Y., et al. "Central nervous system toxicity of metallic nanoparticles," **International Journal of Nanomedicine**, V. 10, 2015, p. 4321–40.
47. Wiogo, H. T. R., Lim, M., Bulmus, V., et al. "Stabilization of magnetic iron oxide nanoparticles in biological media by fetal bovine serum (FBS)," **Langmuir**, V. 27, No. 2, 2011, p. 843–50.
48. Hao, S., Meng, J., Zhang, Y., et al. "Macrophage phenotypic modulation of enhancing bone regeneration by superparamagnetic scaffold upon magnetization," **Biomaterials**, V. 140, 2017, p. 16–25.
49. Meng, Z., Zhou, D., Gao, Y., et al. "miRNA delivery for skin wound healing," **Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 129, 2018, p. 308–18.
50. Heun, Y., Pogoda, K., Anton, M., et al. "HIF-1 α Dependent Wound Healing Angiogenesis In Vivo Can Be Controlled by Site-Specific Lentiviral Magnetic Targeting of SHP-2," **Molecular Therapy**, V. 25, No. 7, 2017, p. 1616–27.
51. Zhang, L., and Zhang, N. "How nanotechnology can enhance docetaxel therapy," **International Journal of Nanomedicine**, V. 8, No. 1, 2013, p. 2927–41.
52. Khan, I., Saeed, K., and Khan, I. "Nanoparticles: Properties, applications and toxicities," **Arabian Journal of Chemistry**, 2017.
53. Maeki, M., Kimura, N., Sato, Y., et al. "Advances in microfluidics for lipid nanoparticles and extracellular vesicles and applications in drug delivery systems," **Advanced Drug Delivery Reviews**, V. 128, 2018, p. 84–100.

54. Xue, H., Guo, P., Wen, W.-C., et al. "Lipid-based nanocarriers for RNA delivery," **Current pharmaceutical design**, V. 21, No. 22, 2015, p. 3140–7.
55. Darwis, Y., Ali Khan, A., Mudassir, J., et al. "Advanced drug delivery to the lymphatic system: lipid-based nanoformulations," **International Journal of Nanomedicine**, V. 8, 2013, p. 2733.
56. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., et al. "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems," **Pharmaceutics**, V. 10, No. 2, 2018, p. 57.
57. Chen, X., Peng, L.-H., Shan, Y.-H., et al. "Astragaloside IV-loaded nanoparticle-enriched hydrogel induces wound healing and anti-scar activity through topical delivery," **International Journal of Pharmaceutics**, V. 447, Nos. 1–2, 2013, p. 171–81.
58. Garcia-Orue, I., Gainza, G., Girbau, C., et al. "LL37 loaded nanostructured lipid carriers (NLC): A new strategy for the topical treatment of chronic wounds," **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, V. 108, 2016, p. 310–6.
59. Li, X., Zhang, X., Yang, H., et al. "Atomic-layered Mn clusters deposited on palygorskite as powerful adsorbent for recovering valuable REEs from wastewater with superior regeneration stability," **Journal of Colloid and Interface Science**, V. 509, 2018, p. 395–405.
60. Motawea, A., Borg, T., and Abd El-Gawad, A. E. G. H. "Topical phenytoin nanostructured lipid carriers: design and development," **Drug Development and Industrial Pharmacy**, V. 44, No. 1, 2018, p. 144–57.
61. Saporito, F., Sandri, G., Bonferoni, M. C., et al. "Essential oil-loaded lipid nanoparticles for wound healing," **International Journal of Nanomedicine**, V. 13, 2018, p. 175–86.
62. Hussain, Z., Thu, H. E., Ng, S. F., et al. "Nanoencapsulation, an efficient and promising approach to maximize wound healing efficacy of curcumin: A review of new trends and state-of-the-art," **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, V. 150, 2017, p. 223–41.

63. Torchilin, V. P. "Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers," **Nature Reviews Drug Discovery**, V. 4, No. 2, 2005, p. 145–60.
64. Mudshinge, S. R., Deore, A. B., Patil, S., et al. "Nanoparticles: Emerging carriers for drug delivery," **Saudi Pharmaceutical Journal**, V. 19, No. 3, 2011, p. 129–41.
65. Rabbani, P. S., Zhou, A., Borab, Z. M., et al. "Novel lipoproteoplex delivers Keap1 siRNA based gene therapy to accelerate diabetic wound healing," **Biomaterials**, V. 132, 2017, p. 1–15.
66. Jangde, R., Srivastava, S., Singh, M. R., et al. "In vitro and In vivo characterization of quercetin loaded multiphase hydrogel for wound healing application," **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 115, 2018, p. 1211–7.
67. Nada, A. A., Arul, M. R., Ramos, D. M., et al. "Bioactive polymeric formulations for wound healing," **Polymers for Advanced Technologies**, V. 29, No. 6, 2018, p. 1815–25.
68. de Carvalho, R. F., Ribeiro, I. F., Miranda-Vilela, A. L., et al. "Leishmanicidal activity of amphotericin B encapsulated in PLGA–DMSA nanoparticles to treat cutaneous leishmaniasis in C57BL/6 mice," **Experimental Parasitology**, V. 135, No. 2, 2013, p. 217–22.
69. Naseri, N., Valizadeh, H., and Zakeri-Milani, P. "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers: Structure preparation and application," **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, V. 5, No. 3, 2015, p. 305–13.
70. Fumakia, M., and Ho, E. A. "Nanoparticles Encapsulated with LL37 and Serpin A1 Promotes Wound Healing and Synergistically Enhances Antibacterial Activity," **Molecular Pharmaceutics**, V. 13, No. 7, 2016, p. 2318–31.
71. Feng, L., and Mumper, R. J. "A critical review of lipid-based nanoparticles for taxane delivery," **Cancer Letters**, V. 334, No. 2, 2013, p. 157–75.

72. Esposito, E., Pecorelli, A., Sguizzato, M., et al. "Production and Characterization of Nanoparticle Based Hyaluronate Gel Containing Retinyl Palmitate for Wound Healing," **Curr Drug Deliv**, V. 15, 2018.
73. Ghasemiyeh, P., and Mohammadi-Samani, S. "Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: applications, advantages and disadvantages.," **Research in pharmaceutical sciences**, V. 13, No. 4, 2018, p. 288–303.
74. Chhibber, S., Kaur, J., and Kaur, S. "Liposome Entrapment of Bacteriophages Improves Wound Healing in a Diabetic Mouse MRSA Infection.," **Frontiers in microbiology**, V. 9, 2018, p. 561.
75. Ghatak, S., Li, J., Chan, Y. C., et al. "AntihypoxamiR functionalized gramicidin lipid nanoparticles rescue against ischemic memory improving cutaneous wound healing," **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, V. 12, No. 7, 2016, p. 1827–31.
76. El-Say, K. M., and El-Sawy, H. S. "Polymeric nanoparticles: Promising platform for drug delivery," **International Journal of Pharmaceutics**, V. 528, Nos. 1–2, 2017, p. 675–91.
77. Souto, E., Severino, P., Polímeros, M. S.-., et al. "Preparação de nanopartículas poliméricas a partir de polímeros pré-formados: parte II," **SciELO Brasil**, n.d.
78. Kayser, O., Lemke, A., and Hernandez-Trejo, N. "The Impact of Nanobiotechnology on the Development of New Drug Delivery Systems," **Current Pharmaceutical Biotechnology**, V. 6, No. 1, 2005, p. 3–5.
79. Scheila Rezende Schaffazick, Silvia Stanisçuaski Guterres, L. de L. F. e A. R. P. "Caracterizaçã{o e Estabilidade Físico-Química de sistemas Poliméricos Nanoparticulados para Administraçã{o de Fármacos," **Química Nova**, V. 26, No. 5, 2003, p. 726–37.
80. Scheler, S., Kitzan, M., and Fahr, A. "Cellular uptake and degradation behaviour of biodegradable poly(ethylene glycol-graft-methyl methacrylate) nanoparticles crosslinked with dimethacryloyl hydroxylamine," **International Journal of Pharmaceutics**, V. 403, Nos. 1–2, 2011, p. 207–18.

81. Nicolas, J., and Couvreur, P. "Synthesis of poly(alkylcyanoacrylate)-based colloidal nanomedicines," **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, V. 1, No. 1, 2009, p. 111–27.
82. Dimer, F. A., Friedrich, R. B., Beck, R. C. R., et al. "IMPACTOS DA NANOTECNOLOGIA NA SAÚDE: PRODUÇÃO DE MEDICAMENTOS," v. vol. 36, 2013, 1520–1526 p.
83. Hussain, Z., Katas, H., Mohd Amin, M. C. I., et al. "Self-assembled polymeric nanoparticles for percutaneous co-delivery of hydrocortisone/hydroxytyrosol: An ex vivo and in vivo study using an NC/Nga mouse model," **International Journal of Pharmaceutics**, V. 444, Nos. 1–2, 2013, p. 109–19.
84. Varshosaz, J., Taymouri, S., Minaiyan, M., et al. "Development and *in vitro* / *in vivo* evaluation of HPMC/chitosan gel containing simvastatin loaded self-assembled nanomicelles as a potent wound healing agent," **Drug Development and Industrial Pharmacy**, V. 44, No. 2, 2018, p. 276–88.
85. Ali, I. H., Khalil, I. A., and El-Sherbiny, I. M. "Single-Dose Electrospun Nanoparticles-in-Nanofibers Wound Dressings with Enhanced Epithelialization, Collagen Deposition, and Granulation Properties," **ACS Applied Materials & Interfaces**, V. 8, No. 23, 2016, p. 14453–69.
86. Chereddy, K. K., Vandermeulen, G., and Pr eat, V. "PLGA based drug delivery systems: Promising carriers for wound healing activity," **Wound Repair and Regeneration**, V. 24, No. 2, 2016, p. 223–36.
87. Chereddy, K. K., Lopes, A., Koussoroplis, S., et al. "Combined effects of PLGA and vascular endothelial growth factor promote the healing of non-diabetic and diabetic wounds," **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine**, V. 11, No. 8, 2015, p. 1975–84.
88. Nurhasni, H., Cao, J., et al. "Nitric oxide-releasing poly(lactic-co-glycolic acid)-polyethylenimine nanoparticles for prolonged nitric oxide release, antibacterial efficacy, and in vivo wound healing activity," **International Journal of Nanomedicine**, V. 10, 2015, p. 3065.

89. "Alginate in Wound Dressings," *Pharmaceutics*, V. 10, No. 2, 2018, p. 42.
90. Mahata, D., Nag, A., Nando, G. B., et al. "Self-Assembled Tea Tannin Graft Copolymer as Nanocarriers for Antimicrobial Drug Delivery and Wound Healing Activity," **Journal of Nanoscience and Nanotechnology**, V. 18, No. 4, 2018, p. 2361–9.
91. Pereira, R., Mendes, A., and Bártolo, P. "Alginate/Aloe Vera Hydrogel Films for Biomedical Applications," **Procedia CIRP**, V. 5, 2013, p. 210–5.
92. Haider, A., Haider, S., Kang, I. K., et al. "A novel use of cellulose based filter paper containing silver nanoparticles for its potential application as wound dressing agent," **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 108, 2018, p. 455–61.
93. Zi-Wei, L., Li, C.-W., Wang, Q., et al. "The Cellular and Molecular Mechanisms Underlying Silver Nanoparticle/Chitosan Oligosaccharide/Poly(vinyl alcohol) Nanofiber-Mediated Wound Healing.," **Journal of biomedical nanotechnology**, V. 13, No. 1, 2017, p. 17–34.
94. Sharma, S., Chockalingam, S., Sanpui, P., et al. "Silver Nanoparticles Impregnated Alginate-Chitosan-Blended Nanocarrier Induces Apoptosis in Human Glioblastoma Cells," **Advanced Healthcare Materials**, V. 3, No. 1, 2014, p. 106–14.
95. Montaser, A. S., Abdel-Mohsen, A. M., Ramadan, M. A., et al. "Preparation and characterization of alginate/silver/nicotinamide nanocomposites for treating diabetic wounds," **International Journal of Biological Macromolecules**, V. 92, 2016, p. 739–47.
96. Gómez Chabala, L., Cuartas, C., and López, M. "Release Behavior and Antibacterial Activity of Chitosan/Alginate Blends with Aloe vera and Silver Nanoparticles," **Marine Drugs**, V. 15, No. 10, 2017, p. 328.
97. Bairagi, U., Mittal, P., Singh, J., et al. "Preparation, Characterization and *in-vivo* evaluation of Nano formulations of Ferulic acid in diabetic wound healing," **Drug Development and Industrial Pharmacy**, 2018, p. 1–32.

CAPÍTULO 10

Aplicação oftalmológica da nanotecnologia

Maíra N. Pereira¹; Marcilio Cunha-Filho¹; Tais Gratieri¹; Guilherme M. Gelfuso^{1,*}

1. Introdução

Os olhos são estruturas extremamente especializadas do corpo humano que contam com inúmeros processos fisiológicos de defesa e proteção¹. Dessa forma, a biodisponibilidade ocular a partir da administração sistêmica de fármacos é afetada por barreiras estáticas como o epitélio corneano, o estroma corneano e a barreira hematoaquosa, que dificultam a difusão passiva do fármaco por impedimentos mecânicos, e por barreiras dinâmicas como o fluxo sanguíneo conjuntival, o fluxo linfático e a drenagem lacrimal, cuja atuação também impede a difusão e a permeação do fármaco para as estruturas oculares.

Já a terapia tópica, que seria preferível no caso de doenças oftálmicas por reduzir possíveis efeitos adversos sistêmicos, frequentemente exhibe baixa eficácia devido à presença de outros mecanismos de proteção, como a secreção lacrimal e o reflexo de piscar, que acabam por promover uma rápida drenagem da formulação. Assim, o curto tempo de permanência da formulação no olho reduz a capacidade do fármaco

1.Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasil

*E-mail: gmelfuso@yahoo.com

de se difundir e penetrar até suas camadas mais interiores². Como resultado, múltiplas doses são convencionalmente necessárias em uma terapia tópica, o que dificulta a adesão do paciente a esse tipo de regime terapêutico³.

Um desafio ainda maior é encontrado quando o fármaco deve exercer sua ação nas estruturas posteriores do olho, como o vítreo e a retina. Nesses casos, as injeções intravítreas normalmente usadas podem apresentar sérias complicações, incluindo descolamento de retina, hemorragia, endoftalmite e catarata. Além disso, vários efeitos adversos associados a uma absorção sistêmica indevida do fármaco podem ocorrer⁴.

Diante de todas as dificuldades encontradas para os tratamentos oftálmicos, a nanotecnologia aporta vantagens importantes, como a possibilidade de controlar a liberação do fármaco no local de ação, reduzindo a frequência de administração e aumentando a permeação de fármacos para as estruturas oculares^{5,6}. Somam-se a isso as vantagens da nanotecnologia no que se refere à veiculação de fármacos de maneira geral, como o incremento da estabilidade do fármaco, a redução de sua incompatibilidade com outros componentes da formulação, o aumento da capacidade de carga de fármaco na formulação, entre outros^{7,8}.

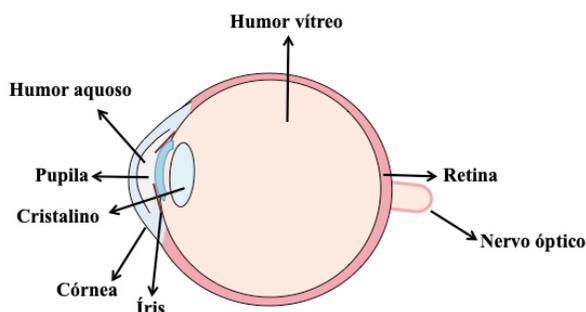
Neste capítulo, serão abordadas e discutidas as aplicações e vantagens que alguns sistemas nanoestruturados desenvolvidos recentemente têm mostrado trazer para os tratamentos oftálmicos, especialmente na sua capacidade em “driblar” os mecanismos de proteção fisiológicos ou de melhorar em certos aspectos o tratamento, incluindo as terapias ditas mais invasivas.

2. O globo ocular e as principais vias oculares de administração de fármacos

O olho é constituído por três camadas básicas^{9,10}. A camada mais externa, também conhecida como fibrosa, é constituída por dois tecidos conjuntivos, a córnea e a esclera, que, juntas, formam o envelope corneoescleral¹¹. Já a camada intermediária é formada pela coroide, íris e corpo ciliar, enquanto a camada interna é a camada nervosa, constituída basicamente pela retina.

O globo ocular (Figura 1) encontra-se dentro de uma caixa óssea protetora, denominada órbita, e consiste em duas partes principais: o segmento anterior do olho, que ocupa aproximadamente um terço do espaço, e o segmento posterior que responde pela porção restante. O segmento anterior inclui pupila, córnea, íris, corpo ciliar, humor aquoso e cristalino, enquanto o segmento posterior é constituído por humor vítreo, retina, coroide, mácula e nervo óptico^{12,13}.

Figura 1. Representação da anatomia ocular



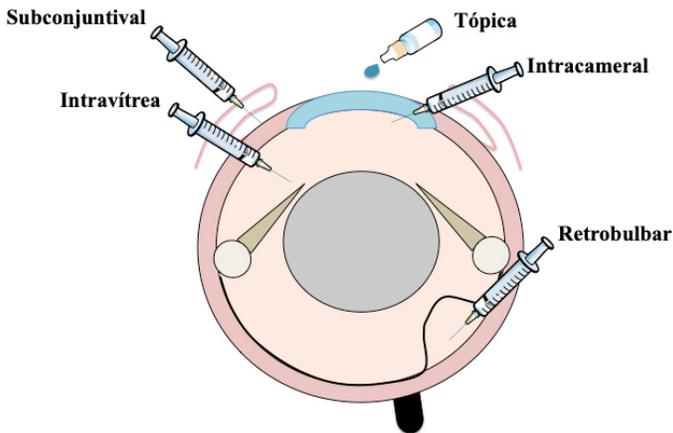
Fonte: elaborado pelos autores.

O humor aquoso é um líquido ultrafiltrado de plasma sanguíneo que preenche tanto a câmara anterior, entre a íris e a córnea, quanto a câmara posterior, entre a íris e o cristalino¹⁴. O espaço vítreo, que é

limitado pela retina e pelo cristalino, apresenta-se repleto de uma substância viscosa e gelatinosa, denominada corpo vítreo¹⁵. Ainda integrando o globo ocular, mas localizados fora dele, encontram-se o aparelho lacrimal e as pálpebras.

As principais vias oculares para administração de fármacos são a subconjuntival, a intravítrea, a retrobulbar e a intracameral (Figura 2), além da via tópica, a qual doenças que afetam a conjuntiva, a córnea e a íris geralmente respondem bem. Já doenças que acometem as pálpebras podem ser tratadas com terapia tópica, mas frequentemente requerem terapias sistêmicas. Da mesma forma, patologias que afetam os tecidos retrobulbar e orbital normalmente precisam ser tratadas sistemicamente¹⁶, assim como é realizado o tratamento de doenças ou condições que afetam a região posterior do olho, uma vez que maioria dos fármacos quando administrados topicamente não consegue aceder a essas regiões¹⁷.

Figura 2. Representação esquemática das principais vias de administração ocular



Fonte: elaborada pelos autores.

3. Sistemas nanoestruturados usados como alternativa a formulações convencionais para tratamentos de doenças que afetam a câmara anterior ocular

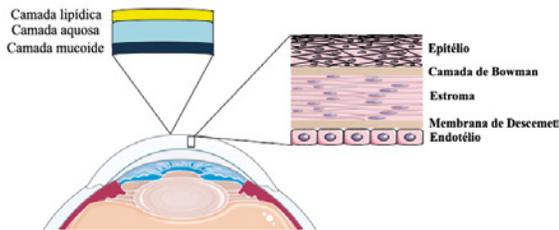
A maioria das doenças que afetam de maneira mais corriqueira as estruturas oculares é tratada com aplicação tópica de fármacos formulados em soluções, suspensões ou pomadas. Apesar de serem comumente usadas, essas preparações apresentam problemas tanto no aspecto farmacotécnico quanto clínico.

A partir de soluções, a retenção do fármaco no local de ação é relativamente baixa, devido principalmente ao baixo volume máximo de formulação comportado na superfície ocular, que é cerca de 30 μL . Considerando-se que o volume de uma gota é de, aproximadamente, 50 μL , grande parte da dose aplicada é perdida pela drenagem do volume excedente através do ducto lacrimal. Além disso, o mecanismo de piscar e a renovação do fluido lacrimal “lavam” a formulação aplicada, fazendo com que o tempo de contato do fármaco administrado com a superfície ocular seja extremamente baixo. Estima-se que apenas cerca de 10% de uma solução convencional permaneçam na superfície ocular após 5 min da administração². Consequentemente, apenas uma fração da dose do fármaco está disponível para a permeação, que deve ainda se difundir através de barreiras fisiológicas até o tecido-alvo.

A região de aplicação dessas preparações, a córnea, é composta por três camadas consecutivas de diferente lipofilia: epitélio, estroma e endotélio, sendo esta última camada formada por células conectadas por sistemas juncionais (*tight junctions*) que impõem dificuldades adicionais à passagem de moléculas através dela (Figura 3). A alternância de lipofilia entre essas camadas, com o epitélio lipofílico, o estroma hidrofílico e o endotélio novamente lipofílico, proporciona uma con-

dição de elevada dificuldade para a partição do fármaco entre essas estruturas. Assim, apenas moléculas moderadamente hidrofílicas ou moderadamente lipofílicas são capazes de se difundirem passivamente através dessas três camadas e atingirem o humor aquoso e tecidos mais internos. Dessa forma, apenas cerca de 1% da dose inicial de fármaco administrado chega a permear a câmara anterior a partir de um colírio convencional¹⁸⁻²⁰.

Figura 3. Representação esquemática do fluido lacrimal pré-córnea e da estrutura da córnea



Fonte: Elaborada pelos autores.

As suspensões são utilizadas para aqueles fármacos insolúveis ou com solubilidade incompleta considerando a alta concentração requerida de fármaco para que a dose esteja contida em pequenos volumes da formulação. A administração na forma de suspensão chega, em alguns casos, a alterar significativamente o tempo de retenção da formulação. Por exemplo, uma instilação única da indometacina na forma de suspensão apresentou níveis 3,7 vezes mais altos de penetração na retina de coelhos em comparação com uma solução oftálmica de indometacina complexada em ciclodextrina contendo a mesma concentração do fármaco ($p < 0,01$). No humor aquoso e no vítreo, os níveis de fármaco foram 4,8 vezes e 4,3 vezes maiores para a formulação em suspensão em comparação com o grupo contendo o fármaco em solução oftálmica ($p < 0,01$) e isso parece estar relacionado ao maior gradiente de concentração de fármaco presente na suspensão em comparação com a solução²¹.

Entretanto, as suspensões nem sempre representam vantagens considerando-se outros aspectos clínicos ou farmacotécnicos. De fato, o tamanho das partículas do fármaco suspenso deve ser controlado, uma vez que partículas acima de 5 μm a 10 μm podem ocasionar irritação ou ainda uma sensação de desconforto como se houvesse areia nos olhos²²⁻²⁴.

Alternativamente, fármacos lipofílicos podem ser incorporados em pomadas lipofílicas ou emulsões, mas, nesses casos, por se tratar de formulações viscosas, a difração da luz é alterada pela formulação causando extremo desconforto de visão após sua aplicação. Por essa razão, esses tipos de formulações são apenas administradas no período noturno²⁵.

Assim, para contornar esses inconvenientes apresentados pelas formulações mais convencionais, diversos sistemas nanoestruturados têm sido propostos como alternativa no tratamento das principais doenças oftálmicas descritas a seguir.

3.1 Glaucoma

Tradicionalmente, os tratamentos para o glaucoma mostram baixa adesão terapêutica devido ao elevado número de vezes em que a formulação deve ser aplicada ao longo do dia. Esse esquema posológico está relacionado a um baixo tempo de permanência do fármaco nas camadas anteriores do olho, que impacta a sua baixa permeação através da córnea^{26,27}.

Sistemas nanoestruturados preparados com polímeros que possuem propriedades mucoadesivas têm mostrado evitar a depuração rápida do fármaco da córnea e aumentar seu tempo de permanência no local de aplicação. Um exemplo disso foi obtido com nanopartículas preparadas com um polímero catiônico (Eudragit®) contendo brimonidina. A aplicação dessas partículas demonstrou reduzir a pressão intraocular de coelhos por 72h por meio da liberação lenta do fármaco, enquanto a solução convencional controlou a pressão por apenas 12h²⁸. Em outro

estudo, nanopartículas de quitosana modificadas com ácido hialurônico e carregadas com cloridrato de dorzolamida e maleato de timolol foram capazes de reduzir significativamente a pressão intraocular em comparação com uma solução simples dos fármacos. Observou-se ainda que a utilização de ácido hialurônico foi capaz de potencializar a mucoadesão corneal dos sistemas, aumentando a sua eficiência²⁹.

Além de partículas preparadas a partir de matrizes poliméricas, sistemas niossomais com revestimento polimérico mucoadesivo contendo brimonidina aumentaram em quase 1,7 vez a concentração máxima de fármaco no humor aquoso (12,46 µg/mL atingidos aos 60 min.) em comparação a uma solução controle (7,2 µg/mL), sendo que as altas concentrações de fármaco alcançadas após a administração desse sistema foram mantidas por até 2 h, em estudo realizado com coelhos³⁰.

Nanopartículas produzidas com outros polímeros biodegradáveis, tais como nanopartículas de ácido poli-l-láctico (PLA)³¹ e poli (ácido láctico-co-ácido glicólico) (PLGA) também demonstraram bom potencial na redução da pressão intraocular. Nanopartículas de PLGA dispersas em hidrogéis com o coencapsulamento de dois fármacos, brimonidina e maleato de timolol, foram avaliadas por meio de sua administração tópica em coelhos. Essa formulação resultou em uma redução sustentada e eficaz da pressão intraocular (aproximadamente 18%) por 4 dias, mantendo-se concentrações significativamente maiores de brimonidina no humor aquoso e na córnea, bem como maleato de timolol no humor aquoso, córnea e conjuntiva por até 7 dias, em comparação aos controles³². A análise histológica da córnea e da conjuntiva tratadas com a formulação não revelou alterações morfológicas ou estruturais e mostrou ausência de citotoxicidade para as células epiteliais da córnea humana, indicando, assim, sua efetividade e segurança para o tratamento do glaucoma³².

O maleato de timolol carregado em nanopartículas impregnadas em lentes de contato foi outra estratégia já testada e que mostrou promover uma liberação continuada do fármaco por até um mês após sua

aplicação. Estudos preliminares realizados em cães da raça *beagle* já demonstraram um nível efetivo de redução da pressão intraocular com a inserção desse tipo de dispositivo³³.

Os sistemas nanoparticulados já estudados, portanto, mostraram ser capazes de proporcionar uma liberação mais consistente e controlada do fármaco através da barreira corneal, gerando um aumento da duração da ação, além de manter a eficácia do tratamento sem comprometer a segurança e o conforto do paciente.

Vantagens também puderam ser observadas ainda que a administração seja realizada de maneira invasiva. A administração de uma única injeção subconjuntival de nanolipossomas para a liberação de latanoprost, em um estudo piloto com 6 pacientes, mostrou segurança e eficácia em indivíduos com diagnóstico de glaucoma pela redução na pressão intraocular clínica de, aproximadamente, 20% nos pacientes tratados com os nanolipossomas ao longo de 3 meses após a sua injeção³⁴.

3.2 Inflamações oculares

O tratamento de inflamações oculares baseia-se principalmente no uso tópico de fármacos anti-inflamatórios não esteroidais e de corticosteroides. O desafio nesse tipo de tratamento também é garantir que esses fármacos atinjam as estruturas afetadas em concentrações terapêuticas e permaneçam no local por um período suficiente para garantir a ocorrência de seu efeito farmacológico³⁵.

Um estudo *in vivo* utilizando exame histopatológico revelou que os olhos de coelhos tratados com nanoemulsão de indometacina resultaram em uma cicatrização maior dos processos inflamatórios em comparação com outras nanopartículas³⁶. Outro estudo *in vivo* com nanoemulsões do tipo óleo-em-água (tamanho médio de gotículas igual a 104,4 nm) incorporando o difluprednato promoveu um aumento de 5,7 vezes de seu metabólito ativo no humor aquoso após uma hora da instilação comparado a uma suspensão oftálmica do mesmo fármaco³⁷.

Esse aumento é atribuído a um efeito de promoção de permeação corneal que os sistemas nanoemulsionados desempenham, devido, principalmente, à utilização de tensoativos não iônicos que podem levar à abertura das *tight junctions* nas células epiteliais, aumentando o transporte transcorneal de fármacos nela incorporados. Além disso, a incorporação de um fármaco extremamente lipofílico é feita em uma formulação aquosa e translúcida, que não causa nenhum tipo de desconforto ao paciente, seja de turvação de visão, seja de sensação arenosa que uma suspensão aquosa poderia ocasionar, uma vez que o fármaco se encontra dissolvido na nanogotícula oleosa. Com base no estudo citado acima, em 2008, o FDA aprovou uma nanoemulsão chamada Durezol (Alcon Laboratories, Fort Worth, TX, EUA) contendo difluprednato para o tratamento da inflamação ocular³⁸.

Os processos inflamatórios normalmente acometem os olhos na região do trato uveal, que é composto por: íris, corpo ciliar e coróide, e esse tipo de inflamação é denominada uveíte³⁹. A uveíte induzida por endotoxinas em olhos de coelhos foi tratada com nanosuspensões preparadas com Eudragit RS100 contendo piroxicam. Os exames *in vivo* revelaram que a inflamação foi inibida pelo fármaco nanoencapsulado de forma significativa ($p < 0,05$) no número de leucócitos no humor aquoso por até 12 h ou mais em comparação com os olhos de coelhos não tratados⁴⁰. A diminuição de quatro fatores inflamatórios após a administração de nanopartículas de PLGA contendo acetonida de triancinolona foi significativamente diferente de outras opções de tratamento com o mesmo fármaco⁴¹.

Nanopartículas poliméricas positivas (potencial zeta na faixa de +40 mV a +60mV) de ibuprofeno preparadas com Eudragit RS100[®] demonstraram garantir níveis do fármaco significativamente maiores ($p < 0,01$) no humor aquoso de coelhos em comparação com o grupo tratado com a solução simples de ibuprofeno⁴². Nesse caso, assim como foi discutido no item anterior, o efeito mucoadesivo desse tipo de nanoestrutura garante um maior tempo de retenção em contato com a córnea, que assegura uma maior taxa de permeação do fármaco através dessa

membrana complexa. Outros sistemas poliméricos nanoparticulados contendo anti-inflamatórios também já demonstraram bom desempenho em termos de permeação corneal, como nanoesferas de PLGA PEGuiladas carregadas com dexibuprofeno (com aproximadamente 200 nm)⁴³ e suspensões de nanopartículas poliméricas preparadas a partir de PLGA e PLGL [poli (lactídeo-co-glicolídeo-leucina)] carregados com diclofenaco sódico⁴⁴. Cabe lembrar que diferentemente das suspensões de fármacos tradicionais, as dispersões nanoparticuladas não causam efeito de irritação ou desconforto ocular devido às suas propriedades coloidais.

Lipossomas contendo diclofenaco também foram capazes de apresentar uma concentração local duas vezes maior na retinacoroide nos olhos de coelhos em comparação com a solução de diclofenaco⁴⁵. Adicionalmente, nanolipossomas contendo acetato de prednisolona apresentaram um efeito anti-inflamatório maior e mais duradouro em comparação com o fármaco não nanoencapsulado em ratos⁴⁶, assim como etoniossomas, que são derivados lipossomais contendo etanol em sua composição, que apresentaram uma biodisponibilidade ocular relativa estimada de 1,54 e 1,75 vez maior de prednisolona do que para a suspensão e solução colírio, respectivamente⁴⁷.

Os carreadores lipídicos nanoestruturados, além de efeito de promoção da penetração corneal, também demonstraram controlar de maneira marcante a liberação de ibuprofeno, levando a um maior tempo de residência no humor aquoso do que o tratamento convencional⁴⁸. O revestimento desse tipo de nanossistema lipídico com oligossacarídeos de quitosana conferiu uma carga positiva a essas partículas lipídicas (potencial zeta igual a +20,7 mV). Esse potencial positivo levou à bioadesão do sistema nos tecidos oculares, demonstrado pela técnica de cintilografia, revelando um retardamento da sua depuração além de um aumento da área sob a curva de 7,7 vezes e um aumento de 2,4 vezes em comparação com o fármaco de referência quando administrados em olhos de coelhos⁴⁹.

Por fim, sistemas micelares carregados com cetorolaco foram aplicados a um modelo de inflamação ocular induzida por citocinas inflamatórias em coelhos e proporcionaram um aumento de duas vezes da biodisponibilidade ocular sem danos na córnea, em comparação com uma suspensão aquosa contendo a mesma quantidade de fármaco⁵⁰.

3.3 Infecções fúngicas

A abordagem farmacológica do manejo de infecções fúngicas envolve a necessidade de formulações contendo agentes antifúngicos muito potentes e que apresentem maior atividade, menor duração do tratamento e supressão da ocorrência de efeitos adversos⁵¹.

Independentemente da via de administração, a maioria dos agentes antifúngicos disponíveis não possui as propriedades físico-químicas necessárias para ser absorvida e atingir os tecidos-alvo da infecção^{20,52}. Assim, lentes de contato à base de hidrogel produzidas com quitosana, nanopartículas de prata e óxido de grafeno contendo voriconazol, um potente agente antifúngico, controlaram a liberação do fármaco por 120h com uma primeira fase correspondendo a uma liberação inicial de rajada nas primeiras 3h devido à rápida difusão da mistura do fármaco com a matriz. Adicionalmente, o valor da concentração inibitória mínima desse sistema foi duas vezes maior para *Fusarium solani* e *Aspergillus fumigatus* em relação ao voriconazol isoladamente⁵³.

Estratégias envolvendo a obtenção de sistemas nanoestruturados mucoadesivos também têm sido pesquisadas com o intuito de aumentar a biodisponibilidade de agentes antifúngicos, como a preparação de um gel mucoadesivo a partir de nanoemulsões carreando cloridrato de terbinafina que apresentaram resultados *in vivo* superiores aos de formulações controles⁵⁴. Carreadores lipídicos nanoestruturados com carga residual positiva (+27,1 mV) administrados em olhos de coelhos apresentaram uma área sob a curva cerca de 4 vezes maior em comparação com os colírios de anfotericina B e tempo de permanência mais longo no humor aquoso⁵⁵. Outro carreador lipídico nanoestruturado catiônico encapsulado voriconazol também proporcionou a penetração

de uma alta concentração de fármaco na córnea de suínos de mais de 12 mg/cm² após 30 min de tratamento⁵⁶. Nanopartículas poliméricas de lecitina e quitosana carregadas com anfotericina B (200 nm) também exibiram propriedades mucoadesivas pronunciadas *in vivo* em olhos de coelhos albinos por um tempo de residência precorneal 3,36 vezes maior e uma biodisponibilidade 2,04 vezes maior que formulações comercializadas¹.

Os lipossomas também ocasionaram aumento da eficácia terapêutica de agentes antifúngicos devido a um efeito promotor que essas nanoestruturas vesiculares desempenham quando aplicadas topicamente na córnea. Um desses sistemas encapsulando fluconazol apresentou maior eficácia (86,4% de melhora) em comparação com a solução tópica do mesmo fármaco (apenas 50% de melhora) em olhos de coelhos ($p = 0,015$)⁵⁷. Outro sistema lipossomal contendo voriconazol mostrou-se não irritante após o teste *in vitro* HET-CAM e foi capaz de fornecer 47,85 g/cm² ± 5,72 g/cm² do fármaco para a córnea de suínos em apenas 30 min de teste *in vitro* de permeação corneal⁵⁸.

O tipo de infecção fúngica de maior recorrência na clínica é a ceratite fúngica, que tem como sítio de infecção a córnea. O tratamento da ceratite é um desafio, pois relaciona tanto a infecção quanto a inflamação que precisam ser resolvidas. Nesse sentido, a expressão de receptores *Toll-Like* (TLR4) nas células epiteliais da córnea aumenta em resposta à infecção. Anticorpos anti-TLR4 foram conjugados na superfície de nanopartículas de gelatina encapsuladas com cetoconazol. O anticorpo anti-TLR4 não apenas facilita a ligação de nanopartículas à córnea, mas também aumenta seu tempo de residência por até 8h em comparação com nanopartículas não revestidas, além de reduzir os níveis de citocinas inflamatórias resultando em uma resolução da infecção nos olhos de ratos infectados por *Aspergillus flavus*⁵⁹.

3.4 Infecções virais

Infecções virais nos olhos podem causar sensação de desconforto e até visão embaçada, e o tratamento tem sido realizado com soluções de aciclovir e ganciclovir. As principais abordagens tecnológicas testadas até aqui foram o desenvolvimento de nanopartículas poliméricas mucoadesivas e a incorporação de nanopartículas poliméricas não invasivas a géis não poliméricos.

No primeiro caso, nanopartículas de quitosana incorporando o aciclovir mostraram ser mucoadesivas e, além disso, desempenharam um perfil de liberação com rápido disparo inicial do fármaco, liberando 52,46% em 12h, seguido por uma liberação sustentada do fármaco por um período de 24h⁶⁰.

Na segunda situação, nanopartículas de PLGA contendo ganciclovir foram formuladas e dispersas em gel polimérico termossensível para o tratamento da ceratite ocasionada pelo vírus herpes simplex tipo 1. Os sistemas nanoestruturados em géis proporcionaram uma liberação *in vitro* contínua do fármaco, sem um efeito de explosão de liberação inicial, e um controle de liberação por 30 dias em comparação aos nanossistemas não incorporados ao gel que liberaram todo o seu conteúdo em menos de 20 dias⁶¹. Esse sistema foi então administrado via instilação tópica em olhos de coelho e apresentaram disponibilidade do fármaco 6 vezes maior no humor aquoso relativo a uma solução de ganciclovir⁶².

3.5 Infecções parasitárias

As infecções oculares também podem ser provocadas por parasitas das diversas espécies causando sintomas catastróficos que variam de desfocagem de visão até a cegueira se não houver rápida intervenção. A ceratite parasitária é um exemplo de doença ocular parasitária acometida por *Acanthamoeba sp.* Nanopartículas de ouro contendo clorexidina mostraram efeitos inibitórios no crescimento dessa espécie de ameba ($p = 0,05$). Em contraste, as amebas tratadas apenas com clorexidina não exibiram efeitos inibidores do crescimento⁶³. Os

dendrímeros são macromoléculas poliméricas repetidamente ramificadas com um amplo espectro de aplicações, principalmente por suas propriedades antimicrobianas. Alguns dendrímeros testados foram eficazes contra a forma trofozoito e dois dendrímeros apresentaram algum efeito contra cistos da *Acanthamoeba*⁶⁴.

As nanopartículas podem, ainda, serem utilizadas para o diagnóstico de infecções parasitárias. Um kit de ensaio imunocromatográfico com nanopartículas de sílica fluorescente ligadas a anticorpos anti-*Acanthamoeba* foi desenvolvido para diagnóstico de ceratite por *Acanthamoeba* e foi capaz de detectar organismos em concentrações baixas (5 trofozoitos ou 40 cistos por amostra), além de ser, aproximadamente, 20 vezes mais sensível que o kit de ensaio imunocromatográfico convencional com marcadores de látex⁶⁵.

3.6 Infecções bacterianas

As infecções no olho também podem ser de origem bacteriana e os tratamentos normalmente são por administração tópica, intraocular ou subconjuntival de medicamentos contendo fármacos dos grupos das tetraciclínas, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos e penicilinas.

O ciprofloxacino, por exemplo, é um antibiótico de largo espectro, muito utilizado em infecções oculares do segmento anterior. Enquanto soluções convencionais mantêm níveis significativos do fármaco na córnea por apenas 3h, nanopartículas lipídicas sólidas demonstram sustentar a liberação de ciprofloxacino em níveis efetivos para o tratamento de endoftalmites por um período de aproximadamente 12h⁶⁶.

A melhora da estabilidade de formulações antibacterianas é outra vantagem conseguida com o uso da nanotecnologia para o preparo de medicamentos oculares, uma vez que a maioria dessas moléculas apresenta certa labilidade. Nesse sentido, nano e microemulsões incorporando moxifloxacina⁶⁷, cloranfenicol⁶⁸, gatifloxacino⁶⁹, dexametasona associada à polimixina B⁷⁰ e ofloxacina⁷¹ mostraram estabilidade bastante superior aos seus medicamentos convencionais na forma de solução ou suspensão.

Vários sistemas contendo nanopartículas poliméricas têm demonstrado aumentar o tempo de residência ocular de fármacos antibióticos. Nanopartículas de PLGA contendo esparfloxacina mostraram boa retenção em olhos de coelho por toda a área pré-córnea em comparação com a formulação comercializada. Além disso, a formulação comercializada eliminou muito rapidamente o fármaco da córnea e alcançou a circulação sistêmica através do sistema de drenagem nasolacrimal, após 6h de administração ocular, enquanto a nanosuspensão desenvolvida diminuiu muito lentamente ($p < 0,05$) permanecendo na superfície da córnea nesse mesmo tempo⁷². De maneira semelhante, enquanto a formulação comercial do levofloxacino foi removida rapidamente da região da córnea e atingiu a circulação sistêmica por meio de drenagem nasolacrimal logo após a sua instilação, nanopartículas de PLGA contendo o mesmo fármaco ficaram tempo em contato da superfície da córnea e não foram observados sinais do fármaco nem nos rins nem na bexiga dos animais após 5h do tratamento⁷³.

Em termos de promoção da permeação de antibióticos, lipossomas contendo ciprofloxacino estenderam permeação corneal do fármaco em, aproximadamente, 3 vezes após 6h da aplicação comparado à solução aquosa do fármaco⁷⁴, assim como nanopartículas lipídicas sólidas carreando gatifloxacino promoveram um aumento 3,37 vezes na biodisponibilidade relativa e tempo de meia vida 2,34 vezes maior em comparação com o colírio de gatifloxacino⁷⁵. Estudos *in vivo* em coelhos também mostraram que carreadores lipídicos nanoestruturados contendo ofloxacina aumentaram o tempo de retenção pré-ocular em quase seis vezes em comparação à formulação comercial contendo o mesmo fármaco⁷⁶.

Os tratamentos utilizando sistemas nanoestruturados também podem ocorrer de forma profilática para cirurgias oftálmicas. Por exemplo, a fim de prevenir a endoftalmite durante a cirurgia de catarata, micropartículas de PLGA mostraram um perfil *in vitro* de liberação sustentada de, aproximadamente 40% de rifampicina por 5 dias, e efeito bactericida contra *Staphylococcus epidermidis*, envolvido, principalmente, na

endofalmitite, com uma eficiência de quase 99% comparado à rifampicina livre, que apresentou apenas efeito bacteriostático com 56% a 58% em 30h de experimento⁷⁷.

3.7 Olho seco

O olho seco é uma desordem multifatorial das lágrimas e da superfície. Atualmente, a ciclosporina A tópica é um dos tratamentos farmacológicos recomendado para sintomas severos de olho seco. Em 2002, a FDA aprovou a utilização de uma nanoemulsão oftálmica (Restasis[®], Allergan Inc., Irvine, CA, EUA) que mostrou um aumento na produção natural de lágrimas. Entretanto, as formulações de gotas oculares são administradas com frequência (duas vezes ao dia para Restasis[®], mas até quatro vezes para muitas formulações tópicas) em altas doses, resultando em aumento dos efeitos colaterais como ardor e sensação de corpo estranho no olho^{38,78}.

Como já foi discutido anteriormente, essas formulações tópicas requerem administração frequente devido à eliminação rápida da superfície ocular. Em vista disso, nanopartículas com propriedades mucoadesivas produzidas com poli (D, L-lactídeo) e dextran incorporando ciclosporina A controlaram a liberação do fármaco por até 5 dias em uma dose única. Os testes *in vivo* em camundongos demonstraram uma redução dos infiltrados inflamatórios, e a superfície ocular foi completamente recuperada com uma única dose por semana e concentração menor do fármaco comparado ao controle comercial (Restasis[®])⁷⁹.

A ciclosporina A também foi incorporada em uma nanossuspensão. Ao entrar em contato com o fluido lacrimal, a formulação precipita e cria sistemas nanoparticulados que entram na córnea e liberam o fármaco por dissolução. Após administração em dose única aos olhos de suínos, foi detectada uma quantidade, aproximadamente, 6 vezes maior de ciclosporina A no tecido corneano em comparação com a formulação comercial Restasis[®]⁸⁰.

Lipossomas contendo ciclosporina A também foram comparados em relação à formulação comercial Restasis® para a síndrome do olho seco induzida em coelhos. A formação de lágrimas nos coelhos induzidos por olho seco foi avaliada usando o teste lacrimal. Após o tratamento, o valor do teste lacrimal melhorou significativamente nos grupos tratados com lipossomas contendo ciclosporina A comparado ao controle comercial ($p = 0,005$)⁸¹.

Nanopartículas de PLGA carregadas positivamente por Eudragit RL100 contendo ciclosporina A também foram capazes de modular a liberação do fármaco em 69,83% a 91,92% em 24h nos tecidos oculares. Dessa forma, o sistema pôde interagir com a superfície do olho, garantindo o contato ideal entre a formulação e a mucosa⁸².

Nanowafers carregados com dexametasona foram avaliados *in vivo* em modelo experimental utilizando ratos. Os animais tratados uma vez ao dia com *nanowafers* foram capazes de restaurar a superfície ocular saudável e a função de barreira da córnea comparado ao colírio dexametasona administrado duas vezes ao dia. Além disso, ocorreu diminuição expressiva de citocinas inflamatórias características do olho seco⁸³.

Uma nanoformulação comercializada, Tears again® (Optima Pharmaceutical GmbH, Alemanha), é um lipossoma contendo fosfolipídios formulados como um spray usado para síndrome de olho seco. Essa formulação de pulverização lipossômica mostrou uma liberação melhorada em relação a outras formulações convencionais⁸⁴.

A literatura reporta ainda vários estudos que estão sendo desenvolvidos para o tratamento do olho seco, entretanto, poucos estudos analisam os nanossistemas em ensaios clínicos. Um estudo (ClinicalTrials.gov NCT02420834) conduzido na Inglaterra pela Universidade de Aston está avaliando, por meio de um ensaio randomizado intervencionista, a eficácia de lágrimas artificiais comparado a um spray lipossômico. Um outro estudo randomizado, simples-cego (ClinicalTrials.gov

NCT02908282), está sendo conduzido atualmente para avaliar a eficácia de uma microemulsão feita de ácidos graxos poliinsaturados e polímeros hidratantes (REMOGEN® OMEGA) para o tratamento do olho seco.

4. Tratamentos de doenças que afetam a câmara posterior ocular utilizando-se sistemas nanoestruturados

Como foi mencionado anteriormente nas seções introdutórias, barreiras anatômicas e fisiológicas impedem que os fármacos atinjam o segmento posterior do olho, principalmente na coroide e na retina. Após a administração tópica, por exemplo, uma fração maior do fármaco é perdida por lacrimação, diluição da lágrima, drenagem nasolacrimal e *turnover* lacrimal. Essas perdas pré-corneais resultam em biodisponibilidade ocular muito baixa. Por outro lado, as junções estreitas da barreira hematoretiniana restringem a entrada dos fármacos quando administrados sistemicamente na retina⁸⁵. Assim, altas concentrações dos fármacos, administração frequente e efeitos colaterais importantes implicam uma grande dificuldade no tratamento de doenças do segmento posterior, que acaba sendo realizado de maneira invasiva^{86,87}.

Dessa forma, o tratamento de doenças do segmento posterior ainda permanece uma tarefa muito desafiadora para o desenvolvimento de formulações. Ainda assim, os sistemas nanoestruturados podem oferecer vantagens terapêuticas no tratamento das principais doenças que acometem a câmara posterior do olho, conforme será apresentado a seguir.

4.1 Inflamações e doenças infecciosas da câmara posterior

A utilização de lipossomas, dendrímeros ou nanomicelas tem mostrado certo potencial para promover o transporte transcorneal de agentes

anti-inflamatórios quando aplicados topicamente. Lipossomas de 174 nm de diâmetro, por exemplo, demonstraram eficiência na liberação 1,8 vez maior de diclofenaco à retina e coróide de coelhos em comparação com a solução do mesmo fármaco⁴⁵. A complexação de dexametasona a dendrímeros de poliamidoamina também mostrou fazer com que o corticosteroide atingisse a retina de coelhos em concentrações de aproximadamente 2,2 vezes maiores em comparação com a suspensão de dexametasona, ambos aplicados topicamente⁸⁸. Esses resultados especificamente seriam uma alternativa promissora para o tratamento da retinopatia diabética, uma vez que a aplicação que é feita atualmente para tratamento dessa condição é invasiva e traz diversos efeitos colaterais ao paciente. Nanomicelas de dexametasona também apresentaram resultados animadores quando da aplicação tópica em olhos de coelhos, uma vez que promoveram o acúmulo de altas concentrações do fármaco ($67,32 \text{ ng/g} \pm 26,49 \text{ ng/g}$) na retina-coroide⁸⁹. Esse tipo de sistema de liberação também demonstrou promover a liberação de altas quantidades de rapamicina na retina-coroide ($362,35 \text{ ng/g} \pm 56,17 \text{ ng/g}$ de tecido) do animal⁹⁰.

Apesar de resultados promissores em ensaios *in vitro* e *in vivo*, um dos poucos ensaios clínicos registrados até o momento para o tratamento tópico de doenças inflamatórias oculares do segmento posterior está em estágio de fases 2 e 3 e trata da investigação de nanopartículas de ciclodextrina contendo dexametasona para o tratamento de edema macular diabético (Identificador ClinicalTrials.gov NCT01523314).

Além da aplicação tópica, outra abordagem seria a utilização de sistemas nanoestruturados para liberação prolongada de anti-inflamatórios após injeções intravítreas. Nesse sentido, um estudo *in vivo* demonstrou que lipossomas encapsulando tacrolimus permaneceram nos fluidos oculares por 14 dias após uma única injeção intravítrea, e durante esse período foram capazes de reduzir a inflamação intraocular⁹¹.

4.2 Degeneração macular

A degeneração macular relacionada à idade (DMRI) representa a principal causa de perda visual irreversível em idosos^{92,93}. A perda de visão mais grave da DMRI está relacionada à neovascularização da coroide (NVC), que é causada por um complexo processo fisiopatológico envolvendo o fator de crescimento endotelial vascular da citocina proangiogênica (VEGF)⁹⁴. Dessa forma, os tratamentos atuais baseiam-se em tratamentos anti-VEGF.

Os tratamentos da degeneração macular demonstram eficácia em retardar o progresso da doença e melhorar a visão, porém requerem múltiplas injeções intravítreas, que causam reações adversas graves, como endoftalmite, descolamento de retina e reações no local da injeção. A estratégia tem sido reduzir o número de injeções prolongando a liberação dos fármacos incorporados em sistemas nanoestruturados.

Diante disso, nanopartículas de polietilenoglicol-b-policaprolactona carregadas com acetato de triancinolona e funcionalizadas com folato (130 nm) apresentaram uma liberação sustentada do fármaco por até 4 semanas em pH 5,5 e 8 semanas em pH 7,4. Além disso, essas nanopartículas foram internalizadas em linha de células do epitélio pigmentar da retina através de endocitose mediada por receptores, e a absorção celular foi significativamente maior comparado às partículas sem modificação de folato. Dessa forma, a captação aumentada e a liberação controlada do fármaco resultaram em expressão gênica antiangiogênica prolongada de células do epitélio pigmentar da retina⁹⁵.

Nanopartículas de poli (orto-éster) carregadas com celecoxibe, um inibidor da ciclooxigenase-2, com uma distribuição de tamanho de 150 nm apresentaram uma liberação prolongada do fármaco promovendo um maior contato do fármaco no olho e, conseqüentemente, os seus efeitos anti-inflamatórios, antiproliferativos e anti-VEGF na retina⁹⁶.

Visando ainda à diminuição dos efeitos adversos ocasionados pelos tratamentos atuais, recentemente, nanopartículas de PLGA foram desenvolvidas como um sistema de liberação de um gene, Flt23k, para inibir a sinalização de VEGF em camundongos. Flt23k é capaz de inibir a expressão de VEGF induzida por hipóxia tanto *in vitro* quanto em modelo de camundongo de neovascularização corneal. Semelhantemente, não ocorrem alterações hematológicas e inflamatórias óbvias ou diminuição da função visual⁹⁷. Esse mesmo sistema polimérico nanoestruturado foi utilizado para o encapsulamento de acetato de triancinolona incorporada em gel e demonstrou uma fácil aplicação como uma solução na transição para a fase de gel com base na temperatura biológica do olho. Além disso, o sistema não foi citotóxico para uma linhagem de células da retina e reduziu significativamente a expressão de VEGF em $43,5\% \pm 3,9\%$ em comparação com uma redução de $1,53\% \pm 11,1\%$ promovida pela triancinolona não encapsulada⁹⁸.

Alguns sistemas nanoestruturados mostraram-se capazes de direcionar os ativos especificamente para a retina, como é o caso de nanopartículas superparamagnéticas produzidas com óxido de ferro. Essas nanopartículas puderam ser direcionadas para células-tronco mesenquimais na retina, usando um ímã orbital, além de manter uma segurança de aplicação local por meio de uma liberação controlada do ativo⁹⁹.

A composição dos sistemas nanoestruturados, em geral, pode contribuir também para os processos terapêuticos da retina. Como exemplo, as nanopartículas de ouro demonstraram ter propriedades antiangiogênicas intrínsecas, e, dessa forma, a injeção intravítrea desse tipo de nanopartículas sem fármacos inibiu a neovascularização da retina em um modelo de ratos^{100,101}.

Como mencionado anteriormente, tratamentos com injeções intravítreas anti-VEGF podem causar atrofia geográfica, infecção e fibrose retiniana. Visando à melhora desses inconvenientes, lipossomas alteram o comportamento biofarmacêutico dos fármacos na liberação ocular^{57,102}. Com isso, lipossomas com carga negativa encapsulando

ranibizumab apresentaram uma liberação sustentada e uma duração de liberação mais longa de 21 dias em comparação com outros lipossomas desenvolvidos. Nesse sentido, os lipossomas são nanocarreadores vesiculares não tóxicos e biocompatíveis, que podem ser utilizados para encapsular agentes terapêuticos para proporcionar liberação sustentada, além de proporcionarem um perfil maior de penetração alcançando um efeito de depósito do fármaco¹⁰³. Outro estudo mostrou que lipossomas contendo bevacizumab foram retidos no humor vítreo em uma concentração cinco vezes superior à do fármaco livre ao longo de 42 dias, demonstrando que os sistemas lipossomais podem aumentar o tempo de residência de fármacos biológicos anti-VEGF após administração intravítrea¹⁰⁴. Além disso, esses sistemas apresentam uma baixa toxicidade, tornando seguros e eficazes para o tratamento da degeneração macular¹⁰⁵.

Atualmente, uma formulação lipossômica contendo Verteporfin, Visudyne® (QLT Ophthalmics, Inc., Menlo Park, CA, Estados Unidos) já foi aprovada para a terapia fotodinâmica para degeneração macular relacionada à idade e encontra-se no mercado⁸⁴.

5. Desafios

Em geral, a nanotecnologia traz novas e promissoras abordagens para o tratamento de doenças oftálmicas. Vários sistemas nanoestruturados têm demonstrado potencial na liberação ocular de fármacos, de modo a possibilitar terapias não invasivas ou pelo menos minimamente invasivas para doenças oculares de diferentes graus de complexidade. Entretanto, vários desafios ainda precisam ser enfrentados para aprimoramento desses inconvenientes. Por exemplo, ainda existem inúmeros estudos que se limitam ao nível *in vitro* e não demonstram a viabilidade dos sistemas nanoestruturados em situações *in vivo*. Além disso, um número ainda mais reduzido de estudos clínicos utilizando-se das nanoformulações desenvolvidas tem sido reportado, o que deve ainda prolongar a espera da sociedade por alternativas nanotecnológicas seguras e eficazes para o tratamento de doenças oculares.

6. Conclusão

A nanotecnologia se apresenta como uma alternativa inovadora para os inconvenientes ocasionados pelos tratamentos oftálmicos atuais. Muitas doenças oculares são crônicas e recorrentes e exigem um longo prazo de tratamento. Assim, a incorporação dos fármacos em sistemas nanoestruturados viabiliza os potentes efeitos dos fármacos por uma diminuição dos efeitos adversos e tóxicos, além de resistir aos aspectos fisiológicos presentes no olho, e assim aumenta o tempo de residência do fármaco no local de ação. Entretanto, pesquisas intensas são necessárias para que esses nanossistemas sejam avaliados clinicamente para chegarem ao mercado.

7. Referências

1. CHHONKER, Y. S. et al. Amphotericin-B entrapped lecithin / chitosan nanoparticles for prolonged ocular application. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72, p. 1451–1458, 2014.
2. GRATIERI, T. et al. Enhancing and sustaining the topical ocular delivery of fluconazole using chitosan solution and poloxamer/chitosan in situ forming gel. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, p. 320–327, 2011.
3. NAIR, A. et al. Nanotechnology in the treatment and detection of intraocular cancers. **J Biomed Nanotechnol.**, v. 4, n. 4, p. 410–418, 2010.
4. OCCHIUTTO, M. L. et al. Breakdown of the Blood-Ocular Barrier as a Strategy for the Systemic Use of Nanosystems. **Pharmaceutics**, v. 4, p. 252–275, 2012.
5. MAINARDES, R. M. et al. Colloidal Carriers for Ophthalmic Drug Delivery. **Current Drug Targets**, v. 6, p. 363–371, 2005.
6. SAHOO, S. K.; DILNAWAZ, F.; KRISHNAKUMAR, S. Nanotechnology in ocular drug delivery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 3–4, 2008.

7. CHANDASANA, H. et al. Corneal targeted nanoparticles for sustained natamycin delivery and their PK / PD indices: An approach to reduce dose and dosing frequency. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 477, n. 1–2, p. 317–325, 2014.
8. PAN, Q. et al. Corticosteroid-loaded biodegradable nanoparticles for prevention of corneal allograft rejection in rats. **Journal of Controlled Release**, 2015.
9. ETHIER, C. R.; JOHNSON, M.; RUBERTI, J. Ocular biomechanics and biotransport. **Annu. Rev. Biomed. Eng.**, v. 6, p. 249–273, 2004.
10. LUDWIG, A. The use of mucoadhesive polymers in ocular drug delivery. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, p. 1595–1639, 2005.
11. BOULTON, M.; ALBON, J. Stem cells in the eye. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 36, p. 643–657, 2004.
12. PATEL, A. et al. Ocular drug delivery systems: An overview. **World J Pharmacol**, v. 2, n. 2, p. 47–64, 2015.
13. WENG, Y. et al. Nanotechnology-based strategies for treatment of ocular disease. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 7, n. 3, p. 281–291, 2017.
14. GOEL, M. et al. Aqueous Humor Dynamics: A Review. **The Open Ophthalmology Journal**, v. 4, p. 52–59, 2010.
15. SMERDON, D. Anatomy of the eye and orbit. **Current Anaesthesia & Critical Care**, v. 11, p. 286–292, 2000.
16. BODDU, S. H.; GUNDA, S.; & R. E.; MITRA, A. K. Ocular microdialysis: a continuous sampling technique to study pharmacokinetics and pharmacodynamics in the eye. **Bioanalysis**, v. 2, n. 3, p. 487–507, 2010.
17. HUGHES, P. M. et al. Topical and systemic drug delivery to the posterior segments. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 57, n. 2005, p. 2010–2032, 2015.
18. KAUR, I. P. et al. Vesicular systems in ocular drug delivery: an overview. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 269, p. 1–14, 2004.

19. GRATIERI, T. et al. Current efforts and the potential of nanomedicine in treating fungal keratitis. **Expert Rev. Ophthalmol.**, v. 5, n. 3, p. 365–384, 2010.
20. EGHARARI, A. O.; RIAZUDDIN, S. A.; GOTTSCH, J. D. **Overview of the Cornea: Structure, Function, and Development**. 1st ed. Elsevier Inc., 2015.
21. BUCOLO, C. et al. Ocular Pharmacokinetics Profile of Different Indomethacin Topical Formulations. **Journal of ocular pharmacology and therapeutics**, v. X, n. X, 2011.
22. CHIANG, C.; TUNG, S.; LU, D.; YEH, M. In Vitro and In Vivo Evaluation of an Ocular Delivery System of 5-Fluorouracil Microspheres. **JOURNAL OF OCULAR PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS**, v. 17, n. 6, p. 545–553, 2001.
23. CHOY, Y. BIN; PARK, J.; PRAUSNITZ, M. R. Mucoadhesive Microparticles Engineered for Ophthalmic Drug Delivery. **J Phys Chem Solids.**, v. 69, n. 5–6, p. 1533–1536, 2010.
24. KAUR, A. et al. Mucoadhesive vaginal drug delivery system: an overview. , v. 6, n. 7, 2016.
25. BARANOWSKI, P. B.; GAJDA, M.; PLUTA, J. Ophthalmic Drug Dosage Forms: Characterisation and Research Methods. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2014, 2014.
26. GUPTA, R. et al. Evaluating Eye Drop Instillation Technique. **J Glaucoma**, v. 21, n. 3, p. 189–192, 2012.
27. STONE, J. L. et al. An Objective Evaluation of Eyedrop Instillation in Patients With Glaucoma. **ARCH OPHTHALMOL**, v. 127, n. 6, p. 732–736, 2017.
28. BHAGAV, P.; UPADHYAY, H.; CHANDRAN, S. Brimonidine Tartrate – Eudragit Long-Acting Nanoparticles: Formulation, Optimization, In Vitro and In Vivo Evaluation. **AAPS PharmSciTech**, v. 12, n. 4, 2011.
29. WADHWA, S. et al. Hyaluronic acid modified chitosan nanoparticles for effective management of glaucoma: development, characterization, and evaluation. **Journal of Drug Targeting**, v. 18, p. 292–302, 2010.

30. KAUR, I. P.; AGGARWAL, D.; SINGH, H. Improved ocular absorption kinetics of timolol maleate loaded into a bioadhesive niosomal delivery system. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, v. 248, p. 1467–1472, 2010.
31. BERTRAM, J. P. et al. Sustained delivery of timolol maleate from poly(lactic-co-glycolic acid)/poly(lactacid) microspheres for over 3 months. **Journal of Microencapsulation**, v. 26, n. 1, p. 18–26, 2009.
32. YANG, H. et al. Hybrid Dendrimer Hydrogel/PLGA Nanoparticle Platform Sustains Drug Delivery for One Week and Anti- glaucoma Effects for Four Days Following One-Time Topical Administration. **acsnano**, , n. 9, p. 7595–7606, 2012.
33. JUNG, H. et al. Glaucoma therapy by extended release of timolol from nanoparticle loaded silicone-hydrogel contact lenses. **Journal of Controlled Release**, v. 165, n. 1, p. 82–89, 2013..
34. WONG, T. et al. Nanomedicine for glaucoma: sustained release latanoprost offers a new therapeutic option with substantial benefits over eyedrops. **Drug Deliv Transl Res.**, v. 4, n. 4, p. 303–309, 2014.
35. LEE, M. Y. et al. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs in the Treatment of Retinal Diseases. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, p. 262–270, 2016.
36. BADAWI, A. A. et al. Chitosan Based Nanocarriers for Indomethacin Ocular Delivery. **Arch Pharm Res**, v. 31, n. 8, p. 1040–1049, 2008.
37. YAMAGUCHI, M. et al. Formulation of an ophthalmic lipid emulsion containing an anti-inflammatory steroidal drug , difluprednate. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 121–128, 2005.
38. CHAURASIA, S. S. et al. Functional Biomaterials Nanomedicine Approaches for Corneal Diseases. **J. Funct. Biomater.**, v. 6, p. 277–298, 2015.
39. LEE, R. W. et al. Autoimmune and autoinflammatory mechanisms in uveitis. **Semin Immunopathol**, 2014.
40. ADIBKIA, K. et al. Piroxicam nanoparticles for ocular delivery: Physicochemical characterization and implementation in endotoxin-induced uveitis. **Journal of Drug Targeting**, v. 15, n. July, p. 407–416, 2007.

41. SABZEVARI, A. et al. Polymeric triamcinolone acetonide nanoparticles as a new alternative in the treatment of uveitis: In vitro and in vivo studies. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 84, n. 1, p. 63–71, 2013.
42. PIGNATELLO, R. et al. Eudragit RS100 nanosuspensions for the ophthalmic controlled delivery of ibuprofen. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, p. 53–61, 2002.
43. SÁNCHEZ-LÓPEZ, E. et al. PEGylated PLGA nanospheres optimized by design of experiments for ocular administration of dexibuprofen– in vitro, ex vivo and in vivo characterization. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 145, p. 241–250, 2016.
44. AGNIHOTRI, S. M.; VAVIA, P. R. Diclofenac-loaded biopolymeric nanosuspensions for ophthalmic application. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 5, n. 1, p. 90–95, 2009.
45. FUJISAWA, T. et al. Liposomal diclofenac eye drop formulations targeting the retina: Formulation stability improvement using surface modification of liposomes. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 564–567, 2012.
46. HOSSEINI, S. H. et al. Preparation and in vitro/pharmacokinetic/pharmacodynamic evaluation of a slow-release nano-liposomal form of prednisolone. **Drug Deliv, Early Online**, v. 7544, p. 1–9, 2016.
47. GAAFAR, P. M. E. et al. Preparation, characterization and evaluation of novel elastic nano-sized niosomes (ethoniosomes) for ocular delivery of prednisolone. **J Liposome Res**, v. 24, n. 3, p. 204–215, 2014.
48. LI, X. et al. Pharmaceutical Nanotechnology A controlled-release ocular delivery system for ibuprofen based on nanostructured lipid carriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, p. 177–182, 2008.
49. LUO, Q. et al. Nanostructured lipid carrier (NLC) coated with Chitosan Oligosaccharides and its potential use in ocular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 403, n. 1–2, p. 185–191, 2010.

50. GUPTA, A. K. et al. Ketorolac entrapped in polymeric micelles : preparation , characterisation and ocular anti-inflammatory studies. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 209, p. 1–14, 2000.
51. GRATIERI, T. et al. Current efforts and the potential of nanomedicine in treating fungal keratitis. **Expert Rev. Ophthalmol.**, v. 5, n. 3, p. 365–384, 2010.
52. MEEK, K. M.; KNUPP, C. Progress in Retinal and Eye Research Corneal structure and transparency. **Progress in Retinal and Eye Research**, p. 1–16, 2015.
53. HUANG, J. et al. A Hydrogel-Based Hybrid Theranostic Contact Lens for Fungal Keratitis. **ACS Nano**, v. 10, p. 6464–6473, 2016.
54. TAYEL, S. A. et al. Promising ion-sensitive in situ ocular nanoemulsion gels of terbinafine hydrochloride: Design, in vitro characterization and in vivo estimation of the ocular irritation and drug pharmacokinetics in the aqueous humor of rabbits. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 443, n. 1–2, p. 293–305, 2013.
55. FU, T.; YI, J.; LV, S.; ZHANG, B. Ocular amphotericin B delivery by chitosan modified nanostructured lipid carriers for fungal keratitis targeted therapy. **Journal of Liposome Research**, v. 27, n. 3, 2016.
56. ANDRADE, L. M. et al. Voriconazole-Loaded Nanostructured Lipid Carriers for Ocular Drug Delivery. **Cornea**, v. 35, n. 6, p. 866–871, 2016.
57. HABIB, F. S. et al. Liposomes as an ocular delivery system of fluconazole: in-vitro studies. **Acta Ophthalmol.**, v. 88, n. 8, p. 901–904, 2010.
58. DE SÁ, F. A. P. et al. Liposomal voriconazole (VOR) formulation for improved ocular delivery. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 133, p. 331–338, 2015.
59. AHSAN, S. M.; RAO, C. M. Condition responsive nanoparticles for managing infection and inflammation in keratitis. **Nanoscale**, v. 9, n. 28, 2017.
60. RAJENDRAN, N. N.; NATRAJAN, R.; R, S. K.; SELVARAJ, S. Acyclovir-loaded chitosan nanoparticles for ocular delivery. **Asian Journal of Pharmaceutics**, v. 4, n. 4, 2010.

61. YANG, X. et al. Nanoparticle-based topical ophthalmic formulation for sustained release of stereoisomeric dipeptide prodrugs of ganciclovir. **Drug Delivery**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2015.
62. AKHTER, S. et al. Ocular pharmacoscintigraphic and aqueous humoral drug availability of ganciclovir-loaded mucoadhesive nanoparticles in rabbits. **European journal of nanomedicine**, v. 5, n. 3, p. 159–167, 2013.
63. AQEEL, Y. et al. Gold Nanoparticle Conjugation Enhances the Antiacanthamoebic Effects of Chlorhexidine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 1283–1288, 2016.
64. HEREDERO-BERMEJO, I. et al. Evaluation of the activity of new cationic carbosilane dendrimers on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba polyphaga*. **Parasitol Res**, v. 114, p. 473–486, 2015.
65. TORIYAMA, K. et al. Development of an immunochromatographic assay kit using fluorescent silica 2 nanoparticles for rapid diagnosis of *Acanthamoeba keratitis*. **J Clin Microbiol.**, v. 53, n. 1, p. 273–277, 2015.
66. SHAZLY, G. A. Ciprofloxacin Controlled-Solid Lipid Nanoparticles : Characterization, In Vitro Release, and Antibacterial Activity Assessment. **BioMed Research International**, v. 2017, 2017.
67. BHARTI, S.; KESAVAN, K. Phase-transition W/O Microemulsions for Ocular Delivery: Evaluation of Antibacterial Activity in the Treatment of Bacterial Keratitis Phase-transition W/O Microemulsions for Ocular Delivery: Evaluation of Antibacterial Activity in the Treatment of Bact. **Ocular Immunology and Inflammation**, v. 25, n. 4, p. 463–474, 2016.
68. LV, F.; ZHENG, L.; TUNG, C. Phase behavior of the microemulsions and the stability of the chloramphenicol in the microemulsion-based ocular drug delivery system. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 301, p. 237–246, 2005.
69. KALAM, M. A. et al. Y. Delivery of gatifloxacin using microemulsion as vehicle: formulation, evaluation, transcorneal permeation and aqueous humor drug determination. **Drug Deliv**, v. 7544, p. 1–12, 2014.

70. LI, X. et al. Mucoadhesive dexamethasone acetate-polymyxin B sulfate cationic ocular nanoemulsion – novel combinatorial formulation concept. **Pharmazie**, v. 71, p. 327–333, 2016
71. ÜSTÜNDAG-OKUR, N. et al. Novel Ofloxacin-Loaded Microemulsion formulations for ocular delivery. **J Ocul Pharmacol Ther.**, v. 30, n. 4, p. 319–332, 2014.
72. GUPTA, H. et al. Sparfloxacin-loaded PLGA nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 6, n. 2, p. 324–333, 2010.
73. GUPTA, H. et al. Biodegradable levofloxacin nanoparticles for sustained ocular drug delivery. **Journal of Drug Targeting**, v. 19, n. 6, p. 409–417, 2011.
74. HOSNY, K. M. Ciprofloxacin as Ocular Liposomal Hydrogel. **AAPS PharmSciTech**, v. 11, n. 1, p. 2–7, 2010.
75. KALAM, M. A. et al. Part II : Enhancement of transcorneal delivery of gatifloxacin by solid lipid nanoparticles in comparison to commercial aqueous eye drops. **J Biomed Mater Res A.**, v. 101, n. 6, p. 1828–1836, 2013.
76. ÜSTÜNDAĞ-OKUR, N. et al. Novel nanostructured lipid carrier-based inserts for controlled ocular drug delivery: evaluation of corneal bioavailability and treatment efficacy in bacterial keratitis Novel nanostructured lipid carrier-based inserts for controlled ocular drug delivery . **Expert Opin Drug Deliv**, v. 21, n. 11, p. 1791–1807, 2015.
77. LEE, M. Y. et al. Microencapsulation of rifampicin for the prevention of endophthalmitis : In vitro release studies and antibacterial assessment. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 505, n. 1–2, p. 262–270, 2016..
78. LIU, S. et al. Phenylboronic acid modified mucoadhesive nanoparticle drug carriers facilitate weekly treatment of experimentally-induced dry eye syndrome. **Nano Research**, v. 8, n. 2, p. 621–635, 2014.

79. LIU, S. et al. Prolonged ocular retention of mucoadhesive nanoparticle eye drop formulation enables treatment of eye diseases using significantly reduced dosage. **Mol. Pharmaceutics**, v. 13, n. 9, p. 2897–2905, 2016.
80. LUSCHMANN, C. et al. Developing an in situ nanosuspension: A novel approach towards the efficient administration of poorly soluble drugs at the anterior eye. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2013.
81. KARN, P. R. et al. Supercritical fluid-mediated liposomes containing cyclosporin A for the treatment of dry eye syndrome in a rabbit model: comparative study with the conventional cyclosporin A emulsion. , p. 3791–3800, 2014.
82. WAGH, V. D.; APAR, D. U. Cyclosporine A Loaded PLGA Nanoparticles for Dry Eye Disease: In Vitro Characterization Studies. **Journal of Nanotechnology**, v. 2014, 2014.
83. COURSEY, T. G. et al. Dexamethasone nanowafer as an effective therapy for dry eye disease. **Journal of Controlled Release**, v. 213, p. 168–174, 2015.
84. VYAS, S. et al. Multidimensional Ophthalmic Nanosystems for Molecular Detection and Therapy of Eye Disorders. **Curr Pharm Des.**, v. 21, n. 22, p. 3223–3238., 2015.
85. JANORIA, K. G. et al. Novel approaches to retinal drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 4, n. 4, p. 371–388, 2007.
86. DUVVURI, S.; MAJUMDAR, S.; MITRA, A. K. Drug delivery to the retina: challenges and opportunities. **Expert Opin. Biol. Ther.**, v. 3, n. 1, p. 45–56, 2003.
87. RAGHAVA, S.; HAMMOND, M.; KOMPPELLA, U. B. Periocular routes for retinal drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 1, n. 1, 2004.
88. YAVUZ, B. et al. In Vitro/In Vivo Evaluation of Dexamethasone — PAMAM Dendrimer Complexes for Retinal Drug Delivery. **J Pharm Sci.**, v. 104, n. 11, p. 3814–3823, 2015.

89. PATEL, S. et al. Development and Evaluation of Dexamethasone Nanomicelles with Potential for Treating Posterior Uveitis After Topical Application. **Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics**, v. 0, n. 0, p. 1–13, 2015.
90. CHOLKAR, K. et al. Nanomicellar Topical Aqueous Drop Formulation of Rapamycin for Back-of-the-Eye Delivery. **AAPS PharmSci-Tech**, v. 16, n. 3, p. 610–622.
91. ZHANG, R. et al. Treatment of Experimental Autoimmune Uveoretinitis with Intravitreal Injection of Tacrolimus (FK506) Encapsulated in Liposomes. **Investigative Ophthalmology & Visual Science**, v. 51, n. 7, 2010.
92. RESNIKOFF, S. et al. Global data on visual impairment in the year 2002. **Bull World Health Organ**, v. 82, n. 11, p. 844–851, 2004.
93. NOWAK, J. Z. Age-related macular degeneration (AMd): pathogenesis and therapy. **Pharmacol Rep.**, v. 58, n. 3, p. 353–363, 2006.
94. GHATE, D.; EDELHAUSER, H. F. Ocular drug delivery. **Expert Opin. Drug Deliv.**, v. 3, n. 2, p. 275–287, 2006.
95. SUEN, W. L.; CHAU, Y. Specific uptake of folate-decorated triamcinolone-encapsulating nanoparticles by retinal pigment epithelium cells enhances and prolongs antiangiogenic activity. **Journal of Controlled Release**, v. 167, n. 1, p. 21–28, 2013..
96. PALAMOOD, M.; JABLONSKI, M. M. Synthesis, Characterization and In vitro studies of Celecoxib-loaded Poly(ortho ester) Nanoparticles Targeted for Intraocular Drug Delivery. **Colloids Surf B Bio-interfaces.**, v. 112, p. 474–482, 2013.
97. ZHANG, X. et al. Targeted Intraceptor Nanoparticle for Neovascular Macular Degeneration : Preclinical Dose Optimization and Toxicology Assessment. **Molecular Therapy**, v. 25, n. 7, p. 1606–1615, 2017.
98. HIRANI, A. et al. Triamcinolone acetonide nanoparticles incorporated in thermoreversible gels for age-related macular degeneration. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 0, n. 0, p. 1–7, 2014.

99. ICHT, O. et al. Comparative Study of Two Cohorts of Newly Diagnosed Crohn's Disease Demonstrates Change in Therapeutic Strategies. **Digestion**, v. 96, n. 3, p. 135–141, 2017.
100. MUKHERJEE, P. et al. Antiangiogenic Properties of Gold Nanoparticles. **Cancer Therapy: Preclinical**, v. 11, n. 9, p. 3530–3535, 2005.
101. HYOUNG, J. et al. The inhibition of retinal neovascularization by gold nanoparticles via suppression of VEGFR-2 activation. **Biomaterials**, v. 32, n. 7, p. 1865–1871, 2011.
102. WONG, T. et al. Nanomedicine for glaucoma: sustained release latanoprost offers a new therapeutic option with substantial benefits over eyedrops. **Drug Deliv Transl Res.**, v. 4, n. 4, p. 303–309, 2014.
103. JOSEPH, R. R.; TAN, D. W. N.; RAMON, M. R. M.; et al. Characterization of liposomal carriers for the trans-scleral transport of Ranibizumab. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16803, 2017.
104. ABRISHAMI, M. et al. Preparation, characterization, and in vivo evaluation of nanoliposomes-encapsulated bevacizumab (avastin) for intravitreal administration. **Retina.**, v. 29, n. 5, p. 699–703, 2009b
105. LI, T. et al. Liposomal hypocrellin B as a potential photosensitizer for age-related macular degeneration: pharmacokinetics, photodynamic efficacy, and skin phototoxicity in vivo. **Photochemical & Photobiological Sciences**, v. 14, n. 5, p. 972–981, 2015. Royal Society of Chemistry.

CAPÍTULO 11

Aplicações da nanotecnologia em desordens e patologias cutâneas

Patrícia Mazureki Campos^{1,*}; Fabíola Silva Garcia Praça²; Marcelo Henrique Kravicz^{2,3}

Introdução

A via tópica é uma rota alternativa para veiculação de substâncias pela pele e produção de efeitos local e sistêmico com diminuição dos efeitos colaterais relacionados às outras vias de administração. Dessa forma, desperta grande interesse para tratamento de doenças cutâneas, o que, por meio dos nanocarreadores (NCs), têm sido alcançados resultados satisfatórios e promissores, principalmente, relacionados à sobreposição da barreira cutânea¹. A aplicação da nanotecnologia comparada com as formulações convencionais oferece vantagens de aumento de solubilidade, proteção contra degradação, aumento da difusão e retenção cutâneas das substâncias carregadas, sendo que podem ser veiculadas substâncias de baixa massa molecular ou macromoléculas de naturezas hidrofílica ou lipofílica².

1. Faculdade de Farmácia, Universidade Estadual de Ponta Grossa, Brasil.

2. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Brasil.

3. Escola de Medicina e Cirurgia, Universidade de Milano-Bicocca, 20854 Monza, Italia.

*E-mail: patimazureki@hotmail.com

A característica de transporte aumentado de substâncias através/na pele pode ser atribuída ao tamanho nanométrico e ao acúmulo de NCs em estruturas cutâneas, como depressões/reentrâncias do estrato córneo, folículos pilosos e aberturas das glândulas sudoríparas écrinas, bem como é atribuída à interação dos NCs com tais estruturas, criando um sistema reservatório, o que favorece saturação localizada da substância carreada com liberação sustentada na pele^{3,4}. Pode ser afirmado que micelas, lipossomas, microemulsão, nanoemulsão e nanocarreadores lipídicos provocam aumento de penetração cutânea e se desintegram, enquanto que nanocarreadores poliméricos permanecem intactos por um tempo mais prolongado, e, em função da composição química, promovem diferentes cinéticas de liberação na pele^{2,5}.

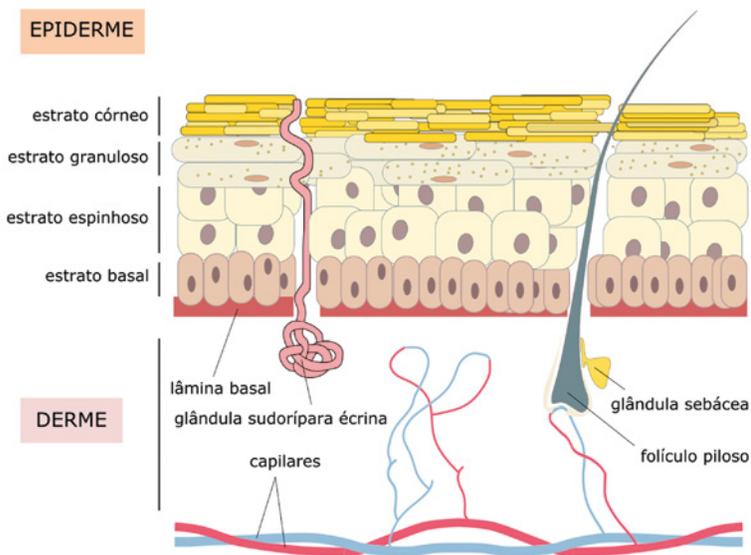
Os NCs têm sido extensamente aplicados em diversas áreas, como: terapêutica, diagnóstica, profilática e cosmética. Eles podem ser direcionados para: tratamento superficial, atingir locais específicos na pele, imunização, promotores de penetração cutânea ou associados com métodos físicos; sendo considerados seguros e eficazes por meio de um desenvolvimento racional. Diversos estudos exemplificam as suas aplicações *in vitro* e *in vivo* relacionadas com as desordens cutâneas, como câncer de pele, psoríase, infecções e inflamações cutâneas, dentre outras^{4,6}.

Dessa forma, abordamos, neste capítulo, os principais aspectos da pele e a interação/relação dos NCs com a barreira cutânea. E, ainda, trazemos a atenção para a aplicação e estudos reportados na literatura que utilizaram tais NCs para tratamento ou intervenção nas desordens e patologias da pele com veiculação por vias de administração tópica e transdérmica.

2. A pele como barreira à penetração de moléculas

A pele humana, também chamada de tecido cutâneo, é o maior órgão do corpo humano e tem papel de barreira essencial entre o organismo e o ambiente externo, atuando na proteção do corpo contra a perda de água e íons, a penetração de micro-organismo e outras moléculas, além de auxiliar no controle de temperatura e na função de reparo⁷. Cobrindo cerca de 2 m² e compreendendo 10% da massa corporal total, o tecido cutâneo é composto por camadas distintas com diferentes composições e propriedades, como ilustrado na **Figura 1**.

Figura 1: Esquema ilustrativo da pele humana



Fonte: elaborado pelos autores.

A epiderme (EP) é a camada mais externa da pele, composta por diferentes estratos de queratinócitos em diversos graus de diferenciação, melanócitos (produção de melanina), células de Merkel (percepção

sensorial) e células de Langerhans (função imunológica). A EP está subdividida em estratos: córneo, translúcido, granuloso e basal⁸. Além disso, é um tecido dinâmico, autorrenovável, no qual a perda das células da superfície do estrato córneo (descamação) é equilibrada pelo crescimento celular na EP inferior (estrato basal). O estrato córneo é a camada mais superficial da EP e mede, aproximadamente, de 10 a 20 micrômetros de espessura. Geralmente, o estrato córneo é constituído de 15 a 30 camadas de células mortas anucleadas, achatadas e ricas em queratina (corneócitos) dispostas em uma matriz lipídica⁹. É uma camada seca e morta que ajuda a evitar a penetração de micro-organismos e a desidratação dos tecidos subjacentes, além de fornecer uma proteção mecânica contra a abrasão para as camadas subjacentes mais delicadas. Os corneócitos nessa camada são descartados periodicamente e são substituídos pelas células advindas do estrato granuloso que são empurradas para cima⁹.

O estrato translúcido é caracterizado como o estrato mais liso e translúcido da EP, composto por células ricas em proteínas lipídicas, as quais fornecem a essas células a aparência translúcida. Esse estrato é exclusivo das regiões das mãos e dos pés. Localizada entre o estrato granuloso e o estrato córneo, os queratinócitos que compõem esse estrato estão mortos e achatados¹⁰. O estrato granuloso é constituído por aproximadamente 3 a 5 camadas de células mais planas, que possuem grande quantidade de proteína acumulada em grânulos lamelares no interior das células, fornecendo um aspecto mais denso para essa camada celular de aparência granulosa devido a novas alterações nos queratinócitos, que foram empurrados do estrato espinhoso¹¹.

O estrato espinhoso é constituído de 8 a 10 camadas de queratinócitos oriundos da divisão celular no estrato basal. Células de Langerhans, que podem fagocitar bactérias, partículas estranhas e células danificadas, são encontradas entre os queratinócitos dessa camada. Os queratinócitos no estrato espinhoso iniciam a síntese de queratina e liberam um glicolípido repelente à água que ajuda a prevenir a perda de água do corpo, tornando a pele relativamente impermeável. À medi-

da que novos queratinócitos são produzidos no topo do estrato basal, os queratinócitos do estrato espinhoso são empurrados para o estrato granuloso¹⁰.

O estrato basal é a camada mais profunda da EP que repousa sobre a lâmina basal, acima da derme. Também chamado de estrato germinativo de geração dos queratinócitos. É nessa camada que os melanócitos produzem a melanina e as células de Merkel atuam como receptores responsáveis por estimular os nervos sensoriais. Ainda, a maioria das desordens cutâneas é originada nessa camada epitelial¹². O estrato basal é composto por camada única de queratinócitos, que estão constantemente em mitose para produzir novas células. À medida que novas células são formadas, as células existentes são empurradas para a superfície ao longo de todo o estrato basal. Logo abaixo do estrato basal está localizada a derme⁹. A derme está inserida entre a EP e o tecido subcutâneo, sendo essa a camada mais profunda da pele, mas também a mais espessa, medindo de 1 a 4 mm. A derme tem a função de sustentar e fortalecer a EP por meio da sua composição, formada por colágeno, proteínas fibrosas de elastina e um gel interfibrilar de glicosaminoglicanos com sais. Além disso, contém vasos sanguíneos e linfáticos, nervos, glândulas sudoríparas e folículos pilosos¹¹. O tecido subcutâneo atua como isolante térmico, amortecedor e depósito de nutrientes e calor para as duas camadas superiores, a derme e a EP.

A função de proteção da pele ocorre devido às suas propriedades físico-químicas (pH, descamação) e à presença de: células imunes (células de Langerhans); melanócitos (proteção contra a radiação ultravioleta); folículos pilosos; glândulas sebáceas (produção de ácidos graxos e lisozima), dentre outras. Entretanto, apesar dessa intrincada e complexa constituição, a pele é atrativa para a administração de fármacos para tratamento de várias patologias cutâneas, as quais são difíceis de tratar por medicamentos administrados pelas vias oral ou parenteral em casos mais graves; sendo elas, acne, dermatite atópica, eczema, psoríase, infecções fúngicas, bacterianas e virais¹¹.

Para que a pele seja utilizada como uma atraente e funcional via de administração de moléculas no combate às patologias cutâneas, se faz necessário que a formulação que contém a substância seja capaz de interromper temporariamente a função barreira da pele, e assim libertar a molécula dentro do tecido cutâneo, e, em seguida, ser eliminada do organismo sem provocar efeitos adversos⁶.

Com efeito, a permeabilidade e a função barreira da pele podem ser modificadas por meio de diferentes influências externas e internas, por exemplo, influências climáticas e físicas, presença de desordens cutâneas e uso de sistemas de liberação de fármacos baseados na nanotecnologia^{13,14}.

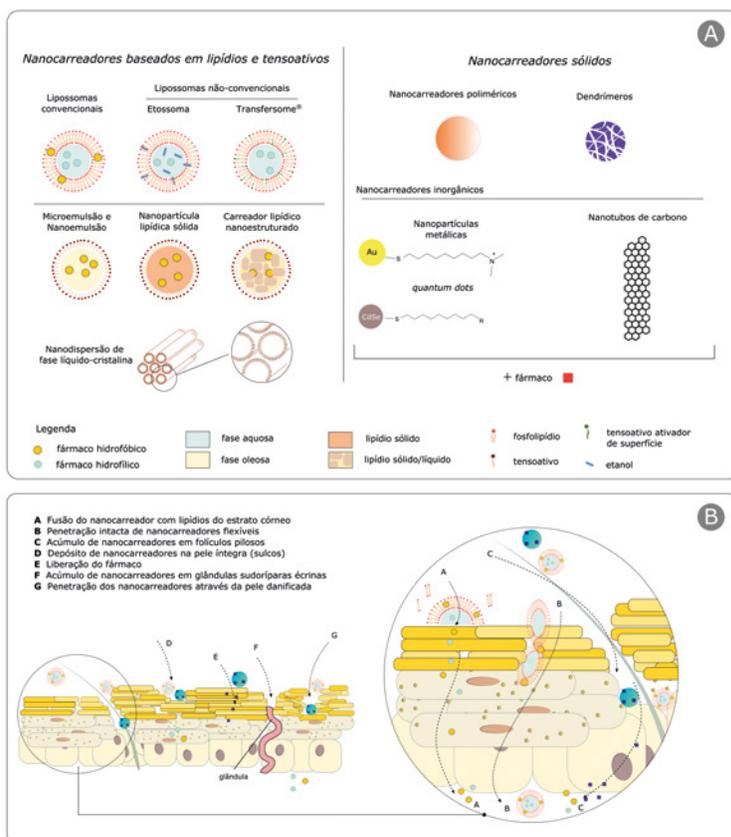
Os avanços tecnológicos nessa área do conhecimento têm estimulado com sucesso o desenvolvimento de sistemas de liberação de fármacos em nanoescala, os nanocarreadores (NCs), para aplicação na prevenção, diagnóstico e tratamento de desordens e patologia cutâneas, principalmente no que se refere ao câncer de pele, modulação e administração de vacinas, medicamentos antimicrobianos e cicatrização de feridas⁶. Em comparação com as outras vias de administração de medicamentos, a pele apresenta várias vantagens, sendo elas: entregar o fármaco diretamente no local da doença, nas células e no tecido-alvo; possibilitar quantidades menores de fármacos para produzir efeito terapêutico; aumentar a biodisponibilidade devido à eliminação do metabolismo hepático de primeira passagem, além de apresentar melhor conforto ao paciente, eliminando as administrações frequentes¹⁵.

3. Nanocarreadores X interação com a barreira cutânea

Os nanocarreadores (NCs) são partículas, em escala nanométrica, definidos como sistemas de liberação de fármacos. Em sua maioria, os NCs são à base de polímeros ou lipídios (sintéticos, semissintéticos ou naturais) com natureza biodegradável e biocompatível. Eles permitem que o fármaco atinja o tecido-alvo com maior eficácia, protegem o fármaco de degradação físico-química e/ou enzimática e, ao mesmo tempo, diminuem os efeitos adversos relacionados ao fármaco veiculado¹⁶. É suposto que os mecanismos mais prováveis de penetração sejam por meio de vias distintas: (i) a via intercelular, na qual os NCs penetraram pelos canais lipídicos entre os corneócitos até as camadas mais profundas da pele, (ii) a via intracelular, pelos corneócitos e/ou (iii) pela via dos apêndices cutâneos (folículos pilosos, glândulas sudoríparas)¹⁷.

Menciona-se que NCs compostos por lipídios e tensoativos podem liberar seu conteúdo na superfície do EC após fusão, desintegração e/ou interação dos NCs com os constituintes do EC. NCs flexíveis penetram através das vias de penetração, de forma intacta, e NCs sólidos como poliméricos, metálicos e quantum dots acumulam-se nas reentrâncias do EC, aberturas dos anexos cutâneos e folículos pilosos, liberando localmente o conteúdo veiculado. A penetração dos NCs é aumentada e com menor impedimento para as condições patológicas que provocam dano à pele e à barreira cutânea, e, por consequência, os NCs penetram livremente e intactos⁴. Um esquema ilustrativo das formas de interação dos NCs com a barreira cutânea está apresentado na **Figura 2**.

Figura 2: Esquema ilustrativo das formas de interação dos diferentes tipos de nanocarreadores (NCs) com a barreira cutânea. O esquema apresenta dois grupos de nanocarreadores, aqui denominados *nanocarreadores baseados em lipídios e tensoativos* e *nanocarreadores sólidos* (A), e tipos de interação dos dois tipos de carreadores com a pele (B)



Fonte: elaborado pelos autores.

O tamanho dos NCs também tem relação direta com a sua penetração através da pele. Como regra geral, os NCs com tamanhos ≥ 600 nm não são capazes de entregar o fármaco nas camadas mais profundas da EP. Essas nanoestruturas tendem a permanecer sobre o estrato córneo. Os NCs com tamanho ≤ 300 nm são capazes de distribuir o fármaco até

certo ponto nas camadas mais profundas da pele; no entanto, aqueles com um tamanho ≤ 70 nm mostraram deposição máxima de conteúdo em ambas as camadas epidérmicas e dérmicas com preferencial acúmulo nos apêndices cutâneos¹⁸.

Outro fator crítico no controle da taxa de penetração dos NCs é a sua composição. Dessa forma, os fatores determinantes relacionados aos NCs para a entrega de substâncias por meio deles são: i) tamanho: maior tamanho, menor penetração; ii) presença de agregação gera menor penetração; iii) forma; iv) potencial zeta; v) recobrimento de superfície ou funcionalização; vi) deformabilidade da vesícula; vii) veículo carreador dos NCs⁴. Assim sendo, NCs contendo diferentes composições químicas e em variadas concentrações estão sendo desenvolvidos com o objetivo de transpor a barreira cutânea e alguns desses exemplos serão discutidos abaixo.

3.1. Nanocarreadores lipídicos

Os NCs lipídicos que compreendem os lipossomas, nanopartículas lipídicas sólidas (NLS), carreadores lipídicos nanoestruturados (CLN), dentre outros, são caracterizados por serem constituídos por material lipídico biodegradável, biocompatível, versátil, que são capazes de encapsular tanto substâncias solúveis em água quanto as lipofílicas¹⁹.

Os lipossomas são considerados a primeira geração de novos sistemas de liberação de fármacos e, por essa razão, têm sido amplamente estudados. Eles são estruturas vesiculares dispostas em uma ou mais bicamadas lipídicas separadas por compartimentos aquosos. Eles possuem a vantagem de possuírem composição lipídica (fosfolipídios e colesterol) semelhante à epiderme, o que lhes permite penetrar na barreira epidérmica com maior facilidade em comparação com outros sistemas de liberação. A maioria dos lipossomas convencionais administrados topicamente na pele forma um reservatório nas camadas superiores do EC, proporcionando ação superficial e localizada¹⁸. Nas últimas décadas, novos lipossomas com flexibilidade aprimorada e com promotores de penetração cutânea, devido à presença de tensoativos

e etanol em sua composição, foram desenvolvidos para aumentar a penetração cutânea dos lipossomas convencionais, dando origem a novas classes de lipossomas, ditos niossomas, transfersomas, etosomas, e outras variações²⁰.

A introdução de tensoativos biocompatíveis na composição dos lipossomas melhora as propriedades da camada córnea, reduzindo a perda de água transepidérmica, o que torna essa camada mais solta e mais permeável²¹. Por outro lado, a presença do etanol reduz o tamanho das vesículas, proporciona carga líquida de superfície negativa e maior estabilidade ao longo do tempo, com aumento de penetração nas camadas da pele^{11,22}. Assim sendo, a associação de tensoativos e etanol na composição desses lipossomas flexíveis aumenta a elasticidade e a deformabilidade das vesículas, e é capaz de modificar o EC, dando origem a uma estrutura lipídica intercelular menos compactada com consequente aumento da partição de fármaco na pele¹¹.

O mecanismo de penetração de NLS e CLN é diferente daqueles observados pelos lipossomas, de modo geral, sua aplicação tópica forma um filme lipídico sobre a pele, devido à composição com materiais de propriedades adesivas. Esse filme formado sobre a pele promove um efeito oclusivo devido à sua hidrofobicidade, assim, a perda de água da pele causada pela evaporação natural é evitada, o que leva a uma redução do empacotamento de corneócitos e a um aumento das lacunas entre os corneócitos. Portanto, o aumento da penetração do fármaco não é resultante da penetração dos NCs nas camadas mais profundas da pele, mas sim do efeito oclusivo provocado pelos NCs²³.

3.2. Nanocarreadores poliméricos

São NCs compostos por polímeros, também chamados de nanopartículas poliméricas, que foram desenvolvidos com sucesso para aplicação tópica. Em sua maioria, são formados por polímeros biodegradáveis sintéticos, como o polímero de ácido láctico (PLA), o polímero de ácido glicólico (PLG) e o seu copolímero ácido poliláctico-glicólico (PLGA) ou ainda, por polímeros naturais, como a quitosana e a gelatina¹⁵. A grande

vantagem desses polímeros na composição dos NCs é a flexibilidade estrutural, que permite alterar as propriedades físico-químicas do sistema de liberação. Por outro lado, a maior preocupação no uso desses NCs está relacionada à toxicidade elevada de polímeros catiônicos e à não biodegradabilidade²⁴.

A penetração cutânea dos NCs poliméricos até as camadas mais profundas da pele também parece ter uma relação direta com o tamanho e a composição das nanopartículas produzidas²⁵⁻²⁷. Investigações recentes comprovaram, por técnica de microscopia confocal e análise de distribuição cutânea das nanopartículas compostas por agente fluorescente, que aproximadamente 50% das nanopartículas poliméricas de PLA ou PLGA com diâmetro de 200 nm acumularam nos folículos pilosos, sugerindo que, quando as nanopartículas estão em contato com a superfície da pele, elas sofrem desestabilização com liberação significativa de agente fluorescente incorporado²⁷. Além disso, foi observado que a cinética de liberação do agente fluorescente depende da sua lipofilicidade e, por isso, pode ser facilmente modulada incorporando componentes com diferentes graus de lipofilia²⁸. Esses resultados demonstram ainda que a via dos apêndices cutâneos representa uma poderosa e atrativa rota de penetração não invasiva das nanopartículas poliméricas para possíveis tratamentos de patologias cutâneas, tratamentos transdérmicos e desenvolvimento de novas vacinas²⁷. Enquanto que as nanopartículas poliméricas com tamanho de 13 nm foram capazes de penetrar livremente pelos corneócitos e se acumularem nas camadas mais profundas da pele em poucas horas após a aplicação sobre a pele¹⁵.

3.3. Microemulsões e Nanoemulsões

Dispersões de fases oleosa e aquosa estabilizadas por tensoativos são conhecidas como microemulsões e nanoemulsões, as quais são sistemas transparentes, monofásicos, opticamente isotrópicos e com estabilidade termodinâmica e cinética, respectivamente²⁹. São geralmente produzidas pela técnica de emulsificação usando recursos de alta ou baixa energia³⁰. Apesar da diferente terminologia, ambas apresentam tamanho das partículas em nanoescala de 20 nm a 200 nm. As microemulsões e as nanoemulsões são geralmente compostas por óleo, água, tensoativos e cotensoativos, sendo que a diferença está na proporção dos constituintes, em que para as microemulsões a quantidade de tensoativo é bem superior comparado com as nanoemulsões^{31,32}. O baixo teor de tensoativos das nanoemulsões oferece reduzida irritação cutânea, entretanto, ambas proporcionam grande área de superfície de contato e distribuição uniforme sobre a pele, além de boa oclusão, formação de um filme lipídico e interação dos tensoativos com constituintes cutâneos, o que favorece permeabilidade através da pele até as camadas mais profundas da EP e consequente diminuição do efeito barreira⁴. Além disso, a presença de sebo nos folículos pilosos favorece a afinidade com os componentes das nanoemulsões, facilitando a penetração/interação cutânea dessas partículas pela via transfolicular³¹.

3.4. Nanodispersões de fase líquido-cristalinas

Nanodispersões de fase líquido-cristalinas obtidas por uma mistura de monoglicerídeo, tensoativos e excesso de água são capazes de interagir com a pele e entregar o fármaco nas camadas mais profundas da EP, alcançando assim o foco das doenças cutâneas, pois associam tamanho nanométrico com a composição química que interage ativamente com a constituição cutânea. Durante as últimas décadas, nanodispersões de fase líquido-cristalinas hexagonais e cúbicas com diâmetros na faixa de 200 nm foram testadas para tratamento de câncer de pele com agente fotossensibilizante na terapia fotodinâmica³³, para tratamento da psoríase utilizando a terapia de silenciamento gênico³⁴ e outras doenças cutâneas inflamatórias na presença de ácido

lipóico³⁵, obtendo resultados promissores. Presença do fármaco nas camadas mais profundas da EP usando nanodispersão de fase hexagonal foi evidenciada quando comparada à nanodispersão de fase cúbica. Esses resultados são justificados a partir da composição no sistema obtido, uma vez que a fase hexagonal foi obtida na presença de tensoativos, ácido oleico, conhecido promotor de permeação cutânea, e diferentes quantidades de monoglicerídeo³³. Assim sendo, a taxa de permeação cutânea das nanodispersões pode ser modulada conforme sua composição química.

3.5. Nanocarreadores inorgânicos

Os diferentes NCs inorgânicos podem ser classificados como nanopartículas metálicas (de prata ou de ouro), nanopartículas baseadas em sílica e nanopartículas de óxido de ferro, dentre outras formas. Eles apresentam as características de penetração cutânea relacionadas com os diâmetros das partículas. Nanopartículas metálicas são excelentes carreadores que penetraram pela via intracelular, uma vez que são facilmente adaptadas para um tamanho desejável de 1 nm a 200 nm³⁶. A penetração dessas nanopartículas metálicas com diferentes escalas nanométricas, na ordem de aproximadamente 15, 100 e 200 nm, foi investigada e as menores nanopartículas penetraram mais profundamente no tecido cutâneo quando comparado com as de maiores diâmetros, as quais foram, principalmente, acumuladas nas camadas mais superficiais da EP³⁷. As nanopartículas de prata são bem conhecidas por seus efeitos antimicrobianos e vêm sendo amplamente utilizadas no tratamento de cicatrização de feridas cutâneas e queimaduras³⁸. No entanto, um alto grau de toxicidade foi observado para as nanopartículas de prata com presença de irritação e corrosão dérmica aguda, principalmente, quando utilizadas em tamanho muito reduzido (10 nm a 30 nm de diâmetro), sugerindo que a exposição dérmica para tamanhos de nanopartículas de prata menores pode ser mais desastrosa do que para tamanhos de nanopartículas maiores³⁹. Por outro lado, quando essas nanopartículas foram revestidas com um polímero biodegradável, o efeito citotóxico foi significativamente reduzido, podendo, assim, ser uma alternativa para o uso mais seguro das

nanopartículas de prata⁴⁰. Quando aplicado topicamente em paciente com 30% de queimaduras de profundidade mista, a toxicidade foi confirmada como reversível. Após uma semana de tratamento, foram observados efeitos de hepatotoxicidade e descoloração acinzentada do rosto do paciente. Os níveis de prata no plasma foram elevados, assim como as enzimas do fígado. Apesar disso, com o final do tratamento, tanto os sintomas clínicos como as enzimas hepáticas retornaram aos valores normais^{41,42}. As vantagens das nanopartículas metálicas estão relacionadas à sua multifuncionalidade, uma vez que estas possuem comportamento de extinção da luz visível, possibilitando o rastreamento das trajetórias das nanopartículas dentro das células cutâneas, portanto, uma excelente ferramenta de diagnóstico³⁶. Além disso, atuam como agentes de hipertermia para destruir as células cancerígenas pela sensibilidade a campos magnéticos e à radiação eletromagnética. Essa propriedade induz a hipertermia para tratamento do câncer com aplicação conjunta em imunoenensaio magnético e também como contraste de ressonância magnética⁴³.

3.6.Dendrímeros

Os dendrímeros são estruturas poliméricas sintéticas, altamente ramificadas e bem definidas, ou seja, oferecem controle sobre o grau e a geração de ramificação em sua estrutura, e, conseqüentemente, nanopartículas poliméricas com baixa polidispersão, o que é uma vantagem significativa sobre outros polímeros⁴⁴. Além disso, geram partículas em tamanho extremamente reduzido. Por exemplo, o diâmetro dos dendrímeros de poli (amido amina) (PAMAM) varia de 1 nm a 10 nm e sua penetração passiva no tecido cutâneo foi confirmada nas camadas mais profundas da pele⁴⁵. Isso pode ser atribuído ao pequeno tamanho do PAMAM e também devido a interações dos dendrímeros catiônicos e os domínios intercelulares da EP carregados negativamente. No entanto, o exato mecanismo de penetração dos dendrímeros ainda não foi totalmente estabelecido. Entende-se que os dendrímeros, por possuírem tamanho reduzido, favorecem a penetração de fármacos pela pele e, como conseqüência, possuem maior coeficiente de difusão⁴⁴.

3.7. Nanotubos de carbono

Os nanotubos de carbono são nanopartículas de carbono estáveis com potente capacidade antioxidante e efeito citoprotetor. Eles são capazes de penetrar na pele através de um mecanismo semelhante à difusão. As características hidrofóbicas dos nanotubos de carbono facilitam sua afinidade com os lipídios da pele e a penetração cutânea de macromoléculas⁴⁶. Nanotubos de carbono contendo fluoreleno nem sempre apresentam penetração cutânea de forma passiva, no entanto, com aplicação de estresse mecânico na pele, como a fricção durante um tempo predeterminado, essas nanopartículas são capazes de penetrar na EP, de forma satisfatória, para exercer seu efeito local, isso se dá devido à propriedade de condutividade do carbono⁴⁷. A grande vantagem dos nanotubos de carbono é a condutividade, o que os torna um sensor altamente sensível para biomarcadores, sendo possível o diagnóstico de infecções crônicas da pele e malignidades em um estágio inicial para posterior tratamento, portanto, considerado um agente eficaz tanto de tratamento como de diagnóstico³⁶.

4. Aplicações das nanotecnologias nas desordens e patologias cutâneas

4.1. Inflamações cutâneas

A inflamação na pele é uma das condições mais frequentes e envolve vermelhidão, inchaço, dor e calor local. Esses sintomas estão presentes em diversas afecções cutâneas que desenvolvem inflamação, como dermatites leve a mais severa, até doenças sistêmicas ou infecções generalizadas. Ainda, há inflamação cutânea em acne, psoríase, queimadura cutânea e em pele exposta à radiação ultravioleta⁴⁸. As mudanças estruturais e fisiológicas da pele inflamada podem direcionar e facilitar a aplicação de NCs, em que a integridade da função barreira e o EC estão prejudicados. O tamanho nanométrico e a grande superfície de contato dos NCs permitem maior exposição às substâncias carregadas, além de direcionamento para local específico pela aplicação

tópica e/ou em casos de funcionalização dos NCs, facilitando o acesso deles na pele para o tratamento da inflamação^{49,50}.

As aplicações tópica ou transdérmica de anti-inflamatórios geram efeitos local ou sistêmico em função do sistema de liberação empregado. A associação de diclofenaco dietilamina com curcumina foi veiculada em NCs transdérmicos em gel, baseados em polímero hidrofílico, fosfolipídio e tensoativo que propiciaram a formação de vesículas flexíveis chamadas transfersomas. Esse carreador, de forma rápida, proporcionou maior biodisponibilidade, com concentrações dos fármacos para exercer efeito anti-inflamatório superior ao produto comercializado em modelo de edema de pata. Tal efeito foi duas vezes maior, sem causar irritação cutânea⁵¹.

A penetração aumentada de moléculas anti-inflamatórias foi conseguida com a veiculação destas por meio de nanoemulsão⁵²⁻⁵⁴. A nanoemulsão contendo eugenol, substância anti-inflamatória proveniente do cravo-da-índia, exibiu potente ação do fármaco após 1 hora e meia da aplicação tópica, isso devido à característica promotora de penetração cutânea da nanoemulsão⁵⁵.

NLS contendo corticosteroides foram aplicadas topicamente com o intuito de prevenir atrofia local. Os NCs promoveram penetração aumentada em EP e derme com liberação sustentada dos corticosteroides. A natureza lipídica e o tamanho dos NCs foram decisivos para o direcionamento na pele, pela interação com os lipídios cutâneos e maior internalização cutânea dos corticosteroides carregados, revelando ser interessante para tratamento da pele inflamada⁵⁶. Ademais, a habilidade de prevenir perda de água transepidérmica, principalmente em pele inflamada, pode ser controlada pelo efeito oclusivo das NLS, que promove melhor hidratação cutânea local⁴⁹.

NCs poliméricos peguילים também foram capazes de aumentar a penetração cutânea de flurbiprofeno, e estes sem peguilação aumen-

taram a retenção cutânea após 24 horas da aplicação tópica do fármaco em pele humana, devido ao efeito reservatório. Em ensaios *in vivo*, os NCs poliméricos exerceram pronunciada ação anti-inflamatória quando comparada com a solução contendo flurbiprofeno, além de não provocarem irritação local no teste de Draize. Fica, portanto, evidenciada a habilidade de acúmulo e contato prolongado dos NCs poliméricos sobre a pele⁵⁷.

A funcionalização de superfície de NCs com peptídeos de penetração celular vem sendo explorada. CLN contendo corticosteroide e funcionalizado com poliarginina, de diferentes massas moleculares, foi aplicado na pele para tratamento de desordens inflamatórias. Foi verificado um aumento significativo na permeação cutânea do fármaco em camadas profundas da pele, com alcance em EP e derme, além de significativamente maior atividade anti-inflamatória⁵⁸.

4.2. Alopecia, Psoríase, Vitiligo

A alopecia é uma desordem capilar que afeta homens e mulheres de todas as idades em todo o mundo e pode levar à perda permanente de cabelo, o que traz estresse psicológico para as pessoas acometidas. A alopecia relacionada com inflamação é de difícil tratamento, pela inflamação se localizar profundamente ao redor da raiz do cabelo ou próximo da região do infundíbulo e região superior do folículo piloso. Dessa maneira, a aplicação de glicocorticoides por meio de NCs possibilita maior contato no local a ser tratado, diminuindo a frequência de aplicação tópica capilar, bem como os efeitos colaterais relacionados à atrofia cutânea⁵⁹. Um exemplo de veiculação de fármacos em NCs poliméricos demonstrou o acúmulo destes em folículos pilosos, o que direcionou as substâncias nesses anexos cutâneos. Assim, pela persistência e interação das substâncias acumuladas nos folículos pilosos, ocorre o sistema reservatório com atividade termodinâmica maximizada da substância e oportuniza entrada rápida para as camadas mais profundas da pele para o tratamento da alopecia^{59,60}.

A psoríase é uma condição crônica de natureza inflamatória autoimune, mediada pelas células T, com patogênese complexa. Manifesta-se como inflamação cutânea superficial com vermelhidão e coceira, proliferação exacerbada dos queratinócitos da EP, queratinização anômala e angiogênese. A psoríase acomete aproximadamente 5% da população mundial e se apresenta de diversas formas⁶¹. Os NCs oferecem vantagens para tratar a psoríase por melhorar a eficácia e a segurança da farmacoterapia. Muitos trabalhos têm utilizado estratégias passiva e ativa para a entrega localizada dos fármacos, envolvendo, por exemplo, lipossomas, NCs poliméricos e lipídicos, micelas poliméricas, microesferas, dentre outros. As estratégias ativas direcionam os NCs para as principais vias bioquímicas envolvidas na patogênese da psoríase, como para as citocinas e células imunológicas, com intuito de diminuir a inflamação local e suprimir o sistema imune de forma eficaz e direcionada⁶¹.

Considerando o controle da produção de citocinas envolvidas no processo inflamatório da psoríase, nanodispersões de fase líquido-cristalina, contendo siRNA (*small interfering RNA*) específico para IL-6, foram capazes de diminuir os níveis extracelulares dessa interleucina após aplicação única em modelo de epiderme reconstruída de psoríase⁶². O sinergismo de tacrolimus, imunossupressor, e curcumina, anti-inflamatório, em lipossomas diminuíram inconvenientes de baixa solubilidade e limitada penetração cutânea desses fármacos, e resultaram em melhora das características fenotípicas da pele psoriática com redução de citocinas inflamatórias (TNF-alfa, IL-17 e IL-22), quando comparado com imiquimode em modelo animal de psoríase⁶³.

Para a supressão da inflamação e hiperproliferação epidérmica, foi feita uma associação de propionato de clobetasol e calcipotriol em uma nanoemulsão, que foi capaz de penetrar em placas psoriáticas sem causar irritação cutânea⁶⁴. NCs poliméricos contendo tacrolimus, eficientemente, promoveram a entrega do imunossupressor na pele de animais com psoríase, resultando em diminuição pronunciada das características histopatológicas locais e efeito terapêutico superior,

quando comparado com a formulação comercial de tacrolimus, Protopic[®]⁶⁵.

A funcionalização de NCs foi empregada como opção de tratamento da psoríase com nanopartículas metálicas. Nanopartículas de ouro foram recobertas com uma camada hidrofílica baseada em tensoativo e metotrexato, constituindo um veículo sem toxicidade, capaz de ser internalizado pelas células e entregar o fármaco na EP e derme acometidas pela psoríase⁶⁶.

O vitiligo é uma desordem cutânea caracterizada por máculas brancas na pele com ausência de melanócitos. Afeta aproximadamente 1% da população mundial e aparece com mais frequência na face, pescoço e couro cabeludo⁶⁷. A etiologia é desconhecida, entretanto, o fator autoimune e a sensibilidade aumentada ao estresse oxidativo foram identificados⁶⁸. O tratamento está baseado em abordar a melanogênese ou o sistema imune com: substâncias clareadoras, fototerapia com psoralenos, moduladores de cálcio, inibidores de calcineurina e corticosteroides ou, ainda, terapias adjuntas com aplicação de fotoprotetores ou maquiagem para “camuflar” as áreas afetadas⁶⁷. Considerando a teoria autoimune, a produção de anticorpos voltados para a proteína transmembrana do melanócito chamada proteína relacionada à tirosinase-1 (TRP-1) e, com subsequente destruição dessa célula, foi modulada pela terapia gênica contendo siRNA-TRP-1 veiculado em nanodispersão de fase líquido-cristalina voltada para aplicação tópica, a qual diminuiu de forma significativa a expressão de TRP-1 em melanócitos⁶⁹. Ainda, tal sistema de liberação é considerado promotor de penetração cutânea por suas características intrínsecas^{70,71}.

A aplicação tópica para o tratamento do vitiligo é preferível e deve conseguir entregar as substâncias terapêuticas na pele em concentração adequada no local específico. Mais uma vez, os NCs oferecem tais vantagens e são úteis para tratar o vitiligo⁷². Uma microemulsão contendo propionato de clobetasol reteve mais fármaco nas camadas da pele devido à modificação estrutural local e ao aumento da

penetração do propionato de clobetasol, cumprindo o papel necessário para formulações de tratamento do vitiligo, bem como opção para repigmentação dessas regiões⁶⁸.

4.3. Dermatite atópica

Dermatite atópica (DA) é uma doença inflamatória cutânea crônica, que influencia negativamente a qualidade de vida, além de onerar o sistema de saúde em muitas dimensões⁷³. Dentre as doenças inflamatórias, a DA é a mais comum, sendo caracterizada por um intenso prurido e pele seca⁷⁴. Pacientes com DA são predispostos a doenças infecciosas cutâneas e sistêmicas⁷³, visto que ocorre uma disfunção da barreira cutânea causando ressecamento, irritação e aumento da permeabilidade a agentes irritantes, alérgenos e patógenos⁷⁵. Ainda, estão associadas comorbidades à DA como asma, rinite alérgica, alergia a alimentos, doenças cardiovasculares e desordens psiquiátricas⁷³, como ansiedade e depressão⁷⁶.

Estratégias para o tratamento da DA incluem amenizar a doença com hidratação e restauração da barreira cutânea com o uso de emolientes, bem como utilizar anti-inflamatórios por meio de administrações tópica ou sistêmica⁷⁴.

Autores relatam em seu estudo com nanopartículas de sílica em modelo de DA provocada pelo alérgeno *Dermatophagoides pteronyssi* que estas podem penetrar na barreira cutânea e induzir vários efeitos biológicos, incluindo modulação da resposta imune. Dessa forma, tais nanomateriais são estudados, especialmente, pelas relações existentes entre a estrutura, as propriedades físico-químicas e a atividade biológica, o que possibilita o delineamento de materiais seguros para serem aplicados no tratamento de DA⁷⁷. Por outro lado, foi utilizado o polímero biodegradável policaprolactona (PCL) em estudos com NCs poliméricos para liberação controlada de hidrocortisona e redução dos efeitos colaterais no tratamento da DA, pois a PCL é um excelente candidato para sistemas de liberação de longa duração por possuir alta estabilidade e degradação lenta⁷⁸.

Estruturas ramificadas de poliglicerol utilizadas em NCs poliméricos representam uma classe de nanopartículas que promovem aumento de internalização de fármacos na pele, devido ao reduzido tamanho das nanopartículas obtidas, como apresentado nos estudos reportados na literatura^{79,80}. Além disso, para estudos de penetração *in vivo* com NCs poliméricos de PLA em uma formulação tópica, um marcador foi encapsulado e foi avaliada a sua permeação em modelo animal com e sem DA. A permeação do marcador diminuiu quando as nanopartículas estavam nas formulações semissólidas, enquanto que a penetração dessas não teve mudança significativa quando estava veiculada em uma suspensão e/ou em formulação semissólida contendo as nanopartículas. Além disso, as nanopartículas não promoveram irritação veiculadas em suspensão e em formulações semissólidas⁸¹.

A utilização de nanopartículas de fulereno (C60) é uma alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias, sendo uma ferramenta para o controle de processos inflamatórios dependentes de espécies reativas de oxigênio (EROs)⁸². Foi demonstrado por meio de modelo animal que dispersões aquosas de nanopartículas de fulereno restauraram a função da barreira cutânea, inibindo a produção de IgE, imunoglobulina específica da DA.

Os NCs inorgânicos de óxidos de titânio são utilizados amplamente em vários produtos, como no tratamento de doenças não relacionadas à pele, mas também nos casos de acne, condiloma, hiperpigmentação e na DA⁸³. Porém, tais NCs inorgânicos podem desempenhar um papel na progressão de doenças de pele e, especificamente, nos seus estudos, exacerbando os sintomas da DA⁸⁴. O tamanho das nanopartículas também deve ser levado em consideração, como observado em estudos com nanopartículas de poliestireno, no qual as nanopartículas causaram maior expressão de quimiocinas, mesmo na ausência de alérgenos, de forma proporcional aos seus tamanhos⁸⁵. Esses resultados podem estar relacionados à não biodegradabilidade dos NCs.

Relacionado às NLS, foi obtido aumento da biodisponibilidade de fármacos, bem como maior estabilidade físico-química para essas moléculas⁸⁶, como nos estudos de NLS para o encapsulamento de resveratrol voltado para o tratamento da dermatite de contato irritante⁸⁷, uma desordem gerada por contato repetitivo da pele com agentes externos⁸⁸.

Sistemas de liberação contendo nanoestruturas híbridas formadas, por exemplo, pela associação de lipídios e PCL, encapsularam o clobetasol⁸⁹. Isso resultou em uma melhor taxa de encapsulação do fármaco para liberação controlada e sustentada, além de propiciar maior eficácia *in vivo*. Outro exemplo de sistema híbrido foi proposto com CLN e prata para a obtenção de uma loção, pois a prata é considerada um ótimo agente antibacteriano, o que provocou diminuição do risco de infecções, como no caso da DA⁹⁰.

4.4. Doenças infecciosas

NCs têm sido estudados na prevenção de doenças infecciosas na pele, principalmente aquelas relacionadas à queimadura e a processos de regeneração, por demonstrarem atividade antimicrobiana contra os microrganismos resistentes dos locais de infecção. Por exemplo, nanopartículas poliméricas, nanoemulsões, lipossomas, NLS, nanopartículas magnéticas⁹¹, bem como nanocompósitos⁹².

Além disso, problemas de resistência microbiana associada ao uso de antibióticos podem ser evitados com a utilização de sistemas poliméricos nanoestruturados⁹³, pois microrganismos podem rapidamente incorporar os NCs contendo o fármaco, e subsequentemente, ocorrer a liberação no citoplasma, de forma controlada, o que aumenta a efetividade do fármaco internalizado através dos NCs⁹³.

A administração tópica de metronidazol, por meio de nanodispersões de fase líquido-cristalina associada com polietilenoimina, foi utilizada para a modulação da permeação e da atividade do fármaco frente ao *Staphylococcus aureus*, patógeno frequentemente encontrado na pele,

que pode causar infecções e até morte. Esse NC permitiu maior retenção cutânea do fármaco e, conseqüentemente, contato prolongado com a bactéria gram positiva possibilitando o tratamento de infecções cutâneas⁹⁴.

No caso do tratamento de acne, patologia oriunda de superprodução de sebo, concentração aumentada de corneócitos nos folículos pilosebáceos e contaminação por bactérias, um fármaco de escolha é a isotretinoína, que é insolúvel em água. A isotretinoína pode ser veiculada em CLN para melhorar a sua solubilidade e protegê-la da degradação pela luz, além de permitir atividade prolongada e diminuir seus efeitos irritativos sobre a pele acneica tratada⁹⁵.

O adapaleno, retinoide de segunda geração, é efetivo no tratamento e desordens cutâneas como a *acne vulgaris*. Tal retinoide foi encapsulado em NLS para aplicação tópica, o qual se acumulou na EP com redução de penetração sistêmica, conforme estudos *in vivo*⁹⁶. Em outro estudo, o mesmo fármaco foi encapsulado em NCs poliméricos, aumentando a sua solubilidade aquosa com diminuição da cristalinidade e, por meio de estudos *in vitro*, verificaram menores índices de irritação em células HaCat e pele humana reconstituída⁹⁷.

A utilização de NLS para redução de efeitos sistêmicos decorrentes da administração oral foi obtida pela encapsulação da espironolactona nesses NCs. O fármaco antiandrogênico veiculado em NLS foi utilizado no tratamento da acne para administração tópica. Em estudo clínico, foi comparada a veiculação da espironolactona em gel alcoólico e em NLS de administração tópica. Ambos os grupos tratados obtiveram melhora para as acnes leve a moderada, apesar de melhor efeito terapêutico demonstrado para as NLS. Tal efeito foi atribuído ao acúmulo das NLS em folículo pilosebáceo, com absorção aumentada e localizada da espironolactona. Além disso, o grupo tratado com as NLS obteve maiores índices de hidratação cutânea pela maior interação das NLS com as estruturas da pele e, também, devido ao efeito oclusivo⁹⁸.

Ainda devido ao acúmulo de NCs em apêndices cutâneos, sistemas micelares compostos por Pluronic® foram preparados com peróxido de benzoíla para melhorar a habilidade da formulação em penetrar em folículos pilosos. O resultado foi aumentada liberação do fármaco nesses locais, constituindo efetiva estratégia para o tratamento da acne⁹⁹.

Com o intuito de penetração cutânea superior, lipossomas deformáveis foram utilizadas para o tratamento de infecções da derme. Foi demonstrada uma penetração cinco vezes maior de compostos hidrofílicos em camadas mais profundas da pele, por meio desses NCs deformáveis, em comparação com a penetração proporcionada por lipossomas convencionais de composição lipídica semelhante¹⁰⁰.

No caso das infecções por fungos, NLS foram desenvolvidas para melhoria de atividade antifúngica da anfotericina B em *Trichophyton rubrum*. Anfotericina B teve permeação cutânea duas vezes maior quando comparada ao fármaco em dispersão, além de estabilidade aumentada a 2, 8 e 25°C por três meses. Em estudo *in vitro* de atividade antifúngica, houve zonas de inibição para as NLS que veicularam o fármaco. Estudos *in vivo* de irritação cutânea não demonstraram nenhum indício de irritação ou eritema na pele, que é característico para esse fármaco antifúngico¹⁰¹.

A griseofulvina foi estudada para aplicação tópica na forma de NLS obtidas por homogeneização de alta pressão. Foi demonstrado tempo de retenção do fármaco quatro vezes maior na epiderme quando comparada com a derme, por meio de estudos em pele de porco. Em estudos *in vitro*, o fármaco demonstrou atividade contra *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes* com concentrações efetivas da ordem de microgramas¹⁰².

Em sistemas emulsionados, uma microemulsão contendo itraconazol foi estudada. Foi apresentada retenção aumentada para o itraconazol na pele após seis horas da aplicação tópica quando comparado com cremes e óleos contendo o fármaco. Por meio de estudos *in vivo* em

modelos de *Tinea pedis*, foi conseguida remissão rápida da infecção fúngica, de efeito terapêutico maior, quando comparado com as formulações comerciais contendo o itraconazol. Além de estabilidade por doze meses, sob refrigeração e em temperatura ambiente, para o fármaco em sistema microemulsionado, portanto, sendo alternativa promissora para o tratamento de infecções fúngicas superficiais¹⁰³.

4.5. Doenças parasitárias

NCs também têm sido aplicados em doenças parasitárias com intuito de diagnóstico, tratamento e vacinação. Nanopartículas de ouro funcionalizadas com anticorpo específico para *Plasmodium falciparum* provaram ser bastante sensíveis para a detecção do antígeno da malária, e a mesma sensibilidade de detecção foi alcançada com nanopartículas de poliestireno conjugadas com anticorpo IgG. Nanopartículas conjugadas com biomarcadores específicos foram utilizadas para o diagnóstico da toxoplasmose, criptosporidiose, amebíase e leishmaniose. Com o intuito de vacinação, diversos NCs foram desenvolvidos para proteção contra a degradação do material genético veiculado nas formulações das vacinas, como os poliméricos e os dendrímeros de PAMAM. Para o tratamento de doenças parasitárias, NCs poliméricos de quitosana e inorgânicos de prata foram considerados potentes terapias para a giardíase e a toxoplasmose, respectivamente, além de lipossomas para o encapsulamento de fármacos antiparasitários¹⁰⁴.

A filariose é uma doença de importância social com grande impacto econômico. É causada por um endoparasita que faz simbiose com bactérias do gênero *Wolbachia* para fertilidade e desenvolvimento dos vermes filarioides. Dessa forma, NCs biodegradáveis baseados em polianidrido veicularam doxiciclina e ivermectina para redução da carga de microfilária e extermínio dos vermes com o intuito de aumentar a adesão terapêutica e reduzir os custos de tratamento¹⁰⁵.

Na leishmaniose cutânea, é necessário efetivo tratamento para curar a infecção e as lesões com presença persistente de resposta imune e inflamatória sem deixar cicatrizes. NCs baseadas em lecitina e quitosa-

na voltadas para a derme encapsularam a β -lapachona para alcançar os macrófagos infectados. Tais NCs permitiram maior penetração cutânea e acúmulo na derme da quinona com diminuição de mediadores inflamatórios e infiltrado de neutrófilos, impedindo a progressão da lesão, apesar de nenhuma redução nas lesões contendo *Leishmania major*¹⁰⁶. Por outro lado, pela via subcutânea, NCs poliméricos de PLGA contendo doxorrubicina foram administrados para alcançar os vasos linfáticos profundos, o que provocou redução intensa da atividade filarioide¹⁰⁷.

Dessa forma, doenças negligenciadas que afetam a pele podem ser beneficiadas de terapias tópicas contendo nanotecnologia por atingirem diretamente o local da lesão com dose diminuída e menores efeitos adversos sistêmicos¹⁰⁸.

4.6. Câncer melanoma e não melanoma

Os cânceres de pele são tumores de crescimento desordenado de células anormais na pele. A maioria dos especialistas concorda que a principal causa do câncer de pele é a exposição excessiva à luz solar. Contudo, exposição repetida aos raios X e a certas substâncias químicas, bem como histórico familiar de câncer de pele, pode aumentar o risco de câncer de pele¹⁰⁹. Diferentes tipos de câncer de pele são denominados conforme seu comportamento clínico e, de um modo geral, podem ser classificados como melanoma cutâneo maligno (MCM), os quais são os mais invasivos e com característica de metástase, além do tipo não melanoma, que são os mais comuns e menos perigosos.

Os cânceres de pele do tipo não melanoma são classificados em carcinoma basocelular (CBC) e carcinoma espinocelular (CEC)¹¹⁰. Eles se encontram nas camadas da EP onde o CBC se origina, na camada mais profunda da EP, enquanto que o CEC tem origem na camada média do EP. Já o câncer de pele MCM se origina nos melanócitos, que são as células produtoras de melanina, com alto poder de disseminação¹¹¹.

Nas últimas décadas, tratamentos de cânceres de pele, tanto não melanoma como melanoma, vêm sendo propostos com sucesso devido à aplicação da nanotecnologia¹¹². Lipossomas, NLS e nanopartículas poliméricas carreando fármacos, por exemplo, doxorrubicina, cisplatina, oxaliplatina, camptotecina, dacarbazina e 5-fluorouracil, assim como porfirinas e ftalocianinas usadas na terapia fotodinâmica, demonstraram alta citotoxicidade para células tumorais e diminuídos efeitos colaterais ao paciente devido à entrega direcionada dos agentes quimioterápicos em células-alvo^{111,113,114}. Com lipossomas flexíveis, foi possível entregar maior quantidade de fármaco nas células cancerígenas quando comparado com os lipossomas convencionais e com o fármaco livre, com consequente melhoria do tratamento^{111,115}.

Os imunolipossomas, lipossomas revestidos por anticorpo específico para células cutâneas cancerígenas, também demonstraram alta eficiência de tratamento quando aplicados ao CEC³⁴. Outra alternativa eficaz para o direcionamento de lipossomas e nanopartículas poliméricas para as células cutâneas tumorais é a funcionalização de superfície com peptídeos de membrana ou transferrina¹¹⁶. Essas moléculas da funcionalização têm a capacidade de direcionar os NCs para as células tumorais, uma vez que essas células estão em constante crescimento e possuem quantidades aumentadas de marcadores celulares, funcionando, portanto, como alvo em potencial para os NCs¹¹⁷. Essa estratégia demonstrou aumento significativo na entrega de doxorrubicina e paclitaxel em ensaios *in vitro* e *in vivo*, com isso, inibindo a proliferação desordenada das células cancerígenas e o crescimento do tumor⁴³.

Outros avanços envolvem o uso dos NCs para a entrega cutânea de siRNA no tratamento do câncer de pele¹¹⁸. A terapia de silenciamento gênico atua por meio da introdução de um siRNA específico nas células tumorais, promovendo alterações na função do RNA mensageiro e, conseqüentemente, inibição da proliferação celular com diminuição do tumor¹¹⁹. Para isso, diferentes tipos de NCs estão sendo aplicados com sucesso na entrega de siRNA específicos para o câncer de pele, com diminuição do volume tumoral e número de células cancerígenas^{120,121}.

Há, ainda, os NCs mais complexos utilizados no câncer de pele, aqueles com características simultâneas de tratamento e diagnóstico, chamados teranósticos, os quais vêm sendo aplicados com nanotubos de carbono e nanopartículas metálicas na terapia de hipertermia tumoral⁴³.

5. Conclusão

Os NCs têm propiciado muitos avanços e alternativas de veiculação de moléculas terapêuticas na pele com o intuito de trazer benefícios clínicos no tratamento e diagnóstico de desordens e patologias cutâneas. A utilização dos NCs representa excelente ferramenta na evolução das formulações de aplicações tópica e transdérmica com diminuídos efeitos adversos e maior efetividade terapêutica, por propiciar maior penetração cutânea e altas concentrações das substâncias nas camadas da pele, devido à interação dos NCs com as estruturas da pele. Portanto, contribuem para maior absorção nos locais onde as patologias se localizam ou maior veiculação sistêmica, dependendo do NC empregado. Assim, futuros tratamentos e práticas diagnósticas permitirão maior precisão e menor desconforto para pacientes portadores de patologias ou desordens cutâneas aliadas aos aspectos de segurança das formulações dermatológicas contendo NCs.

6.Referências

1. WU, X.; GUY, R. H. Applications of nanoparticles in topical drug delivery and in cosmetics. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 19, n. 6, p. 371–384, 1 jan. 2009.
2. VOGT, A. et al. Nanocarriers for drug delivery into and through the skin — Do existing technologies match clinical challenges? **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 3–15, 2016.
3. PATEL, D. et al. **Lipid Nanoparticle a Novel Carrier for Cosmetics and Topical Preparation: A Review**. *Inventi Impact: Cosmetics*, v.4, p. 141–146 , 2015.
4. ROBERTS, M. et al. Topical and cutaneous delivery using nanosystems. **Journal of Controlled Release**, v. 247, p. 86–105, 10 fev. 2017.
5. NEUBERT, R. H. H. Potentials of new nanocarriers for dermal and transdermal drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 1, p. 1–2, 2011.
6. DELOUISE, L. A. Applications of Nanotechnology in Dermatology. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 3, p. 964–975, mar. 2012.
7. BAROLI, B. Penetration of nanoparticles and nanomaterials in the skin: Fiction or reality? **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 99, n. 1, p. 21–50, jan. 2010.
8. DEPIERI, L. V. et al. Advances in the bioanalytical study of drug delivery across the skin. **Therapeutic Delivery**, v. 6, n. 5, p. 571–594, 22 maio 2015.
9. BOLZINGER, M.-A. et al. Penetration of drugs through skin, a complex rate-controlling membrane. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 17, n. 3, p. 156–165, jun. 2012.

10. GOMES, A. P. A. **Nanotecnologia Aplicada ao Tratamento da Acne**. 2013. 61 f. Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias. 2013.
11. SALA, M. et al. Lipid nanocarriers as skin drug delivery systems: Properties, mechanisms of skin interactions and medical applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 535, n. 1–2, p. 1–17, 15 jan. 2018.
12. HUTCHESON, A. C. S.; FISHER, A. H.; LANG, P. G. Basal cell carcinomas with unusual histologic patterns. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 53, n. 5, p. 833–837, nov. 2005.
13. BOUWSTRA, J. A.; PONEC, M. The skin barrier in healthy and diseased state. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 1758, n. 12, p. 2080–2095, dez. 2006.
14. NAIK, A.; KALIA, Y. N.; GUY, R. H. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. **Pharmaceutical Science & Technology Today**, v. 3, n. 9, p. 318–326, set. 2000.
15. ZHANG, Z. et al. Polymeric nanoparticles-based topical delivery systems for the treatment of dermatological diseases. **Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology**, v. 5, n. 3, p. 205–218, maio 2013.
16. FATTAL, E.; VAUTHIER, C. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. Vol. 2; Eds. J. Swarbrick and J. C. Boylan, M. Dekker, Inc. New York 1988, 494 p. v. 2, p. 671–1434, 2007.
17. ALVAREZ-ROMÁN, R. et al. Skin penetration and distribution of polymeric nanoparticles. **Journal of Controlled Release**, v. 99, n. 1, p. 53–62, set. 2004.
18. HUA, S. Lipid-based nano-delivery systems for skin delivery of drugs and bioactives. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. SEP, p. 2011–2015, 30 set. 2015.
19. BOZZUTO, G.; MOLINARI, A. Liposomes as nanomedical devices. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 975, fev. 2015.

20. AMOABEDINY, G. et al. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: A comprehensive review. **International Journal of Polymer Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 67, n. 6, p. 383–400, 13 abr. 2018.
21. GEUSENS, B. et al. Flexible Nanosomes (SECosomes) Enable Efficient siRNA Delivery in Cultured Primary Skin Cells and in the Viable Epidermis of Ex Vivo Human Skin. **Advanced Functional Materials**, v. 20, n. 23, p. 4077–4090, 8 dez. 2010.
22. ASCENSO, A. et al. Development, characterization, and skin delivery studies of related ultradeformable vesicles: Transfersomes, ethosomes, and transethosomes. **International Journal of Nanomedicine**, v. 10, p. 5837–5851, set. 2015.
23. ZHAI, Y.; ZHAI, G. Advances in lipid-based colloid systems as drug carrier for topic delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 193, p. 90–99, nov. 2014.
24. VARKOUHI, A. K. et al. Gene silencing activity of siRNA polyplexes based on biodegradable polymers. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 77, n. 3, p. 450–457, abr. 2011.
25. ZHANG, Y.; CHAN, H. F.; LEONG, K. W. Advanced materials and processing for drug delivery: The past and the future. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 1, p. 104–120, 2013.
26. SCHNEIDER, M. et al. Nanoparticles and their interactions with the dermal barrier. **Dermato-Endocrinology**, v. 1, n. 4, p. 197–206, 27 jul. 2009.
27. BAHAMONDE-NORAMBUENA, D. et al. Polymeric Nanoparticles in Dermocosmetic. **International Journal of Morphology**, v. 33, n. 4, p. 1563–1568, dez. 2015.
28. RANCAN, F. et al. Stability of polylactic acid particles and release of fluorochromes upon topical application on human skin explants. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, n. 1, p. 76–84, jan. 2012.

29. SHAKEEL, F. et al. Nanoemulsions as Vehicles For Transdermal Delivery of Aceclofenac. **AAPS Pharm. Sci. Tech**, v. 8, n. 4, p. 104, 2007.
30. TADROS, T. et al. Formation and stability of nano-emulsions. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 108–109, p. 303–318, maio 2004.
31. NASTITI, C. et al. Topical Nano and Microemulsions for Skin Delivery. **Pharmaceutics**, v. 9, n. 4, p. 37, 21 set. 2017.
32. ALIBERTI, A. L. M. et al. Ketoprofen Microemulsion for Improved Skin Delivery and *In Vivo* Anti-inflammatory Effect. **AAPS Pharm-SciTech**, v. 18, n. 7, p. 2783–2791, 3 out. 2017.
33. PRAÇA, F. S. G. et al. Liquid Crystal Nanodispersions Enable the Cutaneous Delivery of Photosensitizer for Topical PDT: Fluorescence Microscopy Study of Skin Penetration. **Current Nanoscience**, v. 8, n. 4, p. 535–540, 1 jul. 2012.
34. PETRILLI, R. et al. Liquid crystalline nanodispersions functionalized with cell-penetrating peptides for topical delivery of short-interfering RNAs: A proposal for silencing a pro-inflammatory cytokine in cutaneous diseases. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 12, n. 5, p. 1063–1075, 2016.
35. CAMPOS, P. M. **Desenvolvimento de nanopartículas de fase líquido-cristalina funcionalizadas com peptídeos de penetração celular para carreamento do ácido lipóico na pele**. 2016. 191 f. Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. 2016.
36. GUPTA, S. et al. Nanocarriers and nanoparticles for skin care and dermatological treatments. **Indian Dermatology Online Journal**, v. 4, n. 4, p. 267, 2013.
37. SONAVANE, G. et al. In vitro permeation of gold nanoparticles through rat skin and rat intestine: Effect of particle size. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 65, n. 1, p. 1–10, ago. 2008.

38. KOOHI, M. K. et al. Assessment of dermal exposure and histopathologic changes of different sized nano-silver in healthy adult rabbits. **Journal of Physics: Conference Series**, v. 304, n. 1, p. 012028, 6 jul. 2011.
39. RAY, P. C.; YU, H.; FU, P. P. Toxicity and Environmental Risks of Nanomaterials: Challenges and Future Needs. **Journal of Environmental Science and Health, Part C**, v. 27, n. 1, p. 1–35, 17 fev. 2009.
40. LU, W. et al. Effect of surface coating on the toxicity of silver nanomaterials on human skin keratinocytes. **Chemical Physics Letters**, v. 487, n. 1–3, p. 92–96, fev. 2010.
41. TROP, M. et al. Silver-Coated Dressing Acticoat Caused Raised Liver Enzymes and Argyria-like Symptoms in Burn Patient. **The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care**, v. 60, n. 3, p. 648–652, mar. 2006.
42. WANG, L.; WANG, J. Skin penetration of inorganic and metallic nanoparticles. **Journal of Shanghai Jiaotong University (Science)**, v. 19, n. 6, p. 691–697, 30 dez. 2014.
43. VYAS, A. et al. Recent Nanoparticulate Approaches of Drug Delivery for Skin Cancer. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 7, n. 8, p. 620–635, 1 ago. 2012.
44. SUN, M. et al. Dendrimer-mediated drug delivery to the skin. **Soft Matter**, v. 8, n. 16, p. 4301, 2012.
45. KÜCHLER, S. et al. Nanoparticles for skin penetration enhancement – A comparison of a dendritic core-multishell-nanotransporter and solid lipid nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 71, n. 2, p. 243–250, fev. 2009.
46. SIU, K. S. et al. Non-covalently functionalized single-walled carbon nanotube for topical siRNA delivery into melanoma. **Biomaterials**, v. 35, n. 10, p. 3435–3442, 2014.

47. ROUSE, J. H. Polymer-Assisted Dispersion of Single-Walled Carbon Nanotubes in Alcohols and Applicability toward Carbon Nanotube/Sol-Gel Composite Formation. **Langmuir**, v. 21, n. 3, p. 1055–1061, fev. 2005.
48. ABDEL-MOTTALEB, M. M. et al. Nanomedicine strategies for targeting skin inflammation. **Nanomedicine**, v. 9, n. 11, p. 1727–43, 2014.
49. LANDRISCINA, A.; ROSEN, J.; FRIEDMAN, A. Nanotechnology, Inflammation and the Skin Barrier: Innovative Approaches for Skin Health and Cosmesis. **Cosmetics**, v. 2, n. 2, p. 177–186, 2015.
50. RANCAN, F. et al. Drug delivery across intact and disrupted skin barrier: Identification of cell populations interacting with penetrated thermoresponsive nanogels. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 4–11, jul. 2017.
51. CHAUDHARY, H.; KOHLI, K.; KUMAR, V. A novel nano-carrier transdermal gel against inflammation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 465, n. 1–2, p. 175–186, 2014.
52. KIM, B. S. et al. *In vitro* permeation studies of nanoemulsions containing ketoprofen as a model drug. **Drug Delivery**, v. 15, n.7, 2008.
53. SUBRAMANIAN, B. et al. Enhancement of anti-inflammatory property of aspirin in mice by a nano-emulsion preparation. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 11, p. 1533–1539, nov. 2008.
54. KHURANA, S.; JAIN, N. K.; BEDI, P. M. S. Nanoemulsion based gel for transdermal delivery of meloxicam: Physico-chemical, mechanistic investigation. **Life Sciences**, v. 92, n. 6–7, p. 383–392, 2013.
55. ESMAEILI, F. et al. Anti-inflammatory effects of eugenol nanoemulsion as a topical delivery system. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 21, n. 7, p. 887–893, 2 out. 2016.
56. SCHLUPP, P. et al. Drug release and skin penetration from solid lipid nanoparticles and a base cream: A systematic approach from a comparison of three glucocorticoids. **Skin Pharmacology and Physiology**, v. 24, n. 4, p. 199–209, 2011.

57. VEGA, E. et al. Flurbiprofen PLGA-PEG nanospheres: Role of hydroxy- β -cyclodextrin on ex vivo human skin permeation and in vivo topical anti-inflammatory efficacy. **Colloids and Surfaces B: Bio-interfaces**, v. 110, p. 339–346, 2013.
58. P. SHAH, P. et al. Enhanced skin permeation using polyarginine modified nanostructured lipid carriers. **Journal of Controlled Release**, v. 161, n. 3, p. 735–745, 2012.
59. MATHES, C. et al. Nanocarriers for optimizing the balance between interfollicular permeation and follicular uptake of topically applied clobetasol to minimize adverse effects. **Journal of Controlled Release**, v. 223, p. 207–214, 2016.
60. LADEMANN, J. et al. Nanoparticles - An efficient carrier for drug delivery into the hair follicles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 66, n. 2, p. 159–164, 2007.
61. RAHMAN, M. et al. Insight into the Biomarkers as the Novel Anti-Psoriatic Drug Discovery Tool: A Contemporary Viewpoint. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 9, n. 1, Volume 9 , Issue 1 , p. 48–62, 2012.
62. DEPIERI, L. V. et al. RNAi mediated IL-6 in vitro knockdown in psoriasis skin model with topical siRNA delivery system based on liquid crystalline phase. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 105, p. 50–58, 2016.
63. JAIN, A. et al. Tacrolimus and curcumin co-loaded liposphere gel: Synergistic combination towards management of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 243, p. 132–145, dez. 2016.
64. KAUR, A. et al. Nanoemulsion loaded gel for topical co-delivery of clobetasol propionate and calcipotriol in psoriasis. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 4, p. 1473–1482, 2017.
65. GABRIEL, D. et al. Improved topical delivery of tacrolimus: A novel composite hydrogel formulation for the treatment of psoriasis. **Journal of Controlled Release**, v. 242, p. 16–24, nov. 2016.

66. BESSAR, H. et al. Functionalized gold nanoparticles for topical delivery of methotrexate for the possible treatment of psoriasis. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 141, p. 141–147, 2016.
67. KATARE, O. et al. Topical treatment in vitiligo and the potential uses of new drug delivery systems. **Indian Journal of Dermatology, Venereology, and Leprology**, v. 76, n. 3, p. 231, 2010.
68. PATEL, H. K. et al. Topical delivery of clobetasol propionate loaded microemulsion based gel for effective treatment of vitiligo: Ex vivo permeation and skin irritation studies. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 102, p. 86–94, 2013.
69. TOFANI, L. B. et al. In Vitro TyRP-1 Knockdown Based on siRNA Carried by Liquid Crystalline Nanodispersions: an Alternative Approach for Topical Treatment of Vitiligo. **Pharmaceutical Research**, v. 35, n. 5, p. 104, 20 maio 2018.
70. LOPES, L. B. et al. Reverse hexagonal phase nanodispersion of monoolein and oleic acid for topical delivery of peptides: *in vitro* and *in vivo* skin penetration of cyclosporin A. **Pharmaceutical Research**, v. 23, n. 6, p. 1332–1342, 2006.
71. VICENTINI, F. T. M. D. C. et al. Liquid crystalline phase nanodispersions enable skin delivery of siRNA. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 83, n. 1, p. 16–24, 2013.
72. GARG, B. J. et al. Nanosized ethosomes-based hydrogel formulations of methoxsalen for enhanced topical delivery against vitiligo: formulation optimization, *in vitro* evaluation and preclinical assessment. **Journal of Drug Targeting**, v. 24, n. 3, p. 233–246, 15 mar. 2016.
73. NØRRESLET, L. B. et al. The impact of atopic dermatitis on work life - a systematic review. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 32, n. 1, p. 23–38, jan. 2018.
74. NYGAARD, U.; VESTERGAARD, C.; DELEURAN, M. Emerging Treatment Options in Atopic Dermatitis: Systemic Therapies. **Dermatology**, v.233, n 5, p. 344 357, 2017.

75. HENDRICKS, A. J. et al. Sweat mechanisms and dysfunctions in atopic dermatitis. **Journal of Dermatological Science**, v. 89, n. 2, p. 105–111, 1 fev. 2018.

76. PANARESE, F. et al. Atopic dermatitis treatment: what's new on the horizon? **Giornale italiano di dermatologia e venereologia : organo ufficiale, Societa italiana di dermatologia e sifilografia**, v. 153, n. 1, p. 95–101, fev. 2018.

77. HIRAI, T. et al. Amorphous silica nanoparticles size-dependently aggravate atopic dermatitis-like skin lesions following an intradermal injection. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 9, n. 2, 2012.

78. ROSADO, C.; SILVA, C.; REIS, C. P. Hydrocortisone-loaded poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles for atopic dermatitis treatment. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 18, n. 3, p. 710–718, 13 jun. 2013.

79. ALNASIF, N. et al. Penetration of normal, damaged and diseased skin — An in vitro study on dendritic core–multishell nanotransporters. **Journal of Controlled Release**, v. 185, n. 1, p. 45–50, jul. 2014.

80. RADBRUCH, M. et al. Dendritic Core-Multishell Nanocarriers in Murine Models of Healthy and Atopic Skin. **Nanoscale Research Letters**, v. 12, n. 1, p. 64, 23 dez. 2017.

81. BOISGARD, A.-S. et al. Innovative drug vehicle for local treatment of inflammatory skin diseases: Ex vivo and in vivo screening of five topical formulations containing poly(lactic acid) (PLA) nanoparticles. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 116, p. 51–60, jul. 2017.

82. SHERSHAKOVA, N. et al. Anti-inflammatory effect of fullerene C60 in a mice model of atopic dermatitis. **Journal of Nanobiotechnology**, v. 14, n. 1, p. 8, 25 dez. 2016.

83. CROSER, M. et al. Titanium Dioxide Nanoparticle Penetration into the Skin and Effects on HaCaT Cells. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 12, n. 8, p. 9282–9297, 7 ago. 2015.
84. YANAGISAWA, R. et al. Titanium Dioxide Nanoparticles Aggravate Atopic Dermatitis-Like Skin Lesions in NC/Nga Mice. **Experimental Biology and Medicine**, v. 234, n. 3, p. 314–322, 1 mar. 2009.
85. YANAGISAWA, R. et al. Size Effects of Polystyrene Nanoparticles on Atopic Dermatitis-like Skin Lesions in NC/NGA Mice. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 23, n. 1, p. 131–141, jan. 2010.
86. ALI, H.; SINGH, S. K. Biological voyage of solid lipid nanoparticles: a proficient carrier in nanomedicine. **Therapeutic Delivery**, v. 7, n. 10, p. 691–709, 1 out. 2016.
87. SHROTRIYA, S. N.; RANPISE, N. S.; VIDHATE, B. V. Skin targeting of resveratrol utilizing solid lipid nanoparticle-engrossed gel for chemically induced irritant contact dermatitis. **Drug Delivery and Translational Research**, v. 7, n. 1, p. 37–52, 2017.
88. LIN, Y.-K. et al. The Use of Therapeutic Nanoparticulate Systems for Treating Atopic Dermatitis. **Current Nanoscience**, v. 14, n. 1, p. 3–16, 22 dez. 2017.
89. FONTANA, M. C. et al. Improved efficacy in the treatment of contact dermatitis in rats by a dermatological nanomedicine containing clobetasol propionate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 79, n. 2, p. 241–249, out. 2011.
90. KECK, C. M.; SCHWABE, K. Silver-Nanolipid Complex for Application to Atopic Dermatitis Skin: Rheological Characterization, *in vivo* Efficiency and Theory of Action. **Journal of Biomedical Nanotechnology**, v. 5, n. 4, p. 428–436, 1 ago. 2009.
91. MOFAZZAL JAHROMI, M. A. et al. Nanomedicine and advanced technologies for burns: Preventing infection and facilitating wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 123, p. 33–64, jan. 2018.

92. DíEZ-PASCUAL, A. M.; DíEZ-VICENTE, A. L. Wound Healing Bionanocomposites Based on Castor Oil Polymeric Films Reinforced with Chitosan-Modified ZnO Nanoparticles. **Biomacromolecules**, v. 16, n. 9, p. 2631–2644, 14 set. 2015.
93. ÁLVAREZ-PAINO, M.; MUÑOZ-BONILLA, A.; FERNÁNDEZ-GARCÍA, M. Antimicrobial Polymers in the Nano-World. **Nanomaterials**, v. 7, n. 2, p. 48, 22 fev. 2017.
94. VICTORELLI, F. D. et al. Metronidazole-Loaded Polyethyleneimine and Chitosan-Based Liquid Crystalline System for Treatment of Staphylococcal Skin Infections. **J Biomed Nanotechnol**, v. 14, n. 1, p. 227–237, 1 jan. 2018.
95. PATWEKAR, S. L.; PEDEWAD, S. R.; GATTANI, S. Development and evaluation of nanostructured lipid carriers-based gel of isotretinoin. **Particulate Science and Technology**, v. 36, n. 7, p. 832–843, 3 out. 2018.
96. JAIN, A. K. et al. Adapalene loaded solid lipid nanoparticles gel: An effective approach for acne treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 121, p. 222–229, set. 2014.
97. RAMEZANLI, T.; ZHANG, Z.; MICHNIAK-KOHN, B. B. Development and characterization of polymeric nanoparticle-based formulation of adapalene for topical acne therapy. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 13, n. 1, p. 143–152, 2017.
98. KELIDARI, H. R. et al. Spironolactone loaded nanostructured lipid carrier gel for effective treatment of mild and moderate acne vulgaris: A randomized, double-blind, prospective trial. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 47–53, 1 out. 2016.
99. KAHRAMAN, E. et al. Polymeric micellar nanocarriers of benzoyl peroxide as potential follicular targeting approach for acne treatment. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 146, p. 692–699, 1 out. 2016.
100. Z, V.; AM, H.; N, S.-B. (Phospho) lipid-based Nanosystems for Skin Administration. **Current Pharmaceutical Design**, v. 4192, n. 1, p. 4174–4192, 2015.

101. BUTANI, D.; YEWALE, C.; MISRA, A. Topical Amphotericin B solid lipid nanoparticles: Design and development. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 139, p. 17–24, 1 mar. 2016.
102. TAN, Y. J. et al. *In vitro* evaluation of griseofulvin loaded lipid nanoparticles for topical delivery. **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 31, p. 1–10, 1 fev. 2016.
103. KUMAR, N.; SHISHU. D-optimal experimental approach for designing topical microemulsion of itraconazole: Characterization and evaluation of antifungal efficacy against a standardized Tinea pedis infection model in Wistar rats. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 67, p. 97–112, jan. 2015.
104. ABAZA, S. Applications of nanomedicine in parasitic diseases. **Parasitologists United Journal**, v. 9, n. 1, p. 1–6, 2016.
105. BINNEBOSE, A. M. et al. Polyanhydride Nanoparticle Delivery Platform Dramatically Enhances Killing of Filarial Worms. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 10, 2015.
106. MORENO, E. et al. Assessment of β -lapachone loaded in lecithin-chitosan nanoparticles for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis in *L. major* infected BALB/c mice. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 11, n. 8, p. 2003–2012, 2015.
107. SINGH, Y. et al. Subcutaneously Administered Ultrafine PLGA Nanoparticles Containing Doxycycline Hydrochloride Target Lymphatic Filarial Parasites. **Molecular Pharmaceutics**, v. 13, n. 6, p. 2084–2094, 2016.
108. SIMOES, S.; GASPAR, M. C. AND M. M. Lipid-Based Nanocarriers for Cutaneous Leishmaniasis and Buruli Ulcer Management. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 43, p. 6577–6586, 2016.
109. GUPTA, V.; TRIVEDI, P. *In vitro* and *in vivo* characterization of pharmaceutical topical nanocarriers containing anticancer drugs for skin cancer treatment. **Lipid Nanocarriers for Drug Targeting**, p. 563–627, 2018.

110. ORTHABER, K. et al. Skin Cancer and Its Treatment: Novel Treatment Approaches with Emphasis on Nanotechnology. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, p. 1–20, 2017.
111. DIANZANI, C. et al. Drug Delivery Nanoparticles in Skin Cancers. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.
112. NAVES, L. B. et al. Nanotechnology for the treatment of melanoma skin cancer. **Progress in Biomaterials**, v. 6, n. 1–2, p. 13–26, 2017.
113. HAFEEZ, A.; KAZMI, I. Dacarbazine nanoparticle topical delivery system for the treatment of melanoma. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16517, 28 dez. 2017.
114. BHARADWAJ, R. et al. Topical delivery of paclitaxel for treatment of skin cancer. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 42, n. 9, p. 1482–1494, 4 set. 2016.
115. FANG, Y.-P. et al. Comparison of 5-aminolevulinic acid-encapsulated liposome versus ethosome for skin delivery for photodynamic therapy. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 356, n. 1–2, p. 144–152, 2008.
116. BOAKYE, C. H. A.; PATEL, K.; SINGH, M. Doxorubicin liposomes as an investigative model to study the skin permeation of nanocarriers. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 489, n. 1–2, p. 106–116, jul. 2015.
117. FU, H. et al. Tumor-Targeted Paclitaxel Delivery and Enhanced Penetration Using TAT-Decorated Liposomes Comprising Redox-Responsive Poly(Ethylene Glycol). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 104, n. 3, p. 1160–1173, mar. 2015.
118. YOUNG, S. W. S.; STENZEL, M.; JIA-LIN, Y. Nanoparticle-siRNA: A potential cancer therapy? **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 98, p. 159–169, fev. 2016.
119. RUAN, R. et al. Topical and Targeted Delivery of siRNAs to Melanoma Cells Using a Fusion Peptide Carrier. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 29159, 4 set. 2016.

120. VENUGANTI, V. V. K. et al. Topical gene silencing by iontophoretic delivery of an antisense oligonucleotide–dendrimer nanocomplex: the proof of concept in a skin cancer mouse model. **Nanoscale**, v. 7, n. 9, p. 3903–3914, 2015.
121. SHERWANI, M. A. et al. Dendrosome mediated topical gene silencing by PLK-1 specific siRNA: implication in treatment of skin cancer in mouse model. **RSC Advances**, v. 6, n. 8, p. 6843–6857, 2016.

PARTE III

MEIO AMBIENTE

CAPÍTULO 12

Nanotecnologias para descontaminação de águas

Alex Fabiano Cortez Campos¹

1. Introdução

Nas últimas décadas, a disponibilidade de água potável para consumo, uso doméstico e em aplicações industriais tem sido um tema de preocupação global. Um relatório recente da Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 2,1 bilhões de pessoas no mundo não têm acesso a um abastecimento de água com qualidade, e que 4,5 bilhões de pessoas sequer têm saneamento adequado¹. A aceleração da escassez de água é um dos problemas ambientais mais críticos do séc. XXI, e as previsões mais pessimistas apontam que em 2025 cerca de 3,5 bilhões de pessoas terão um abastecimento inadequado de água². Considerando o aumento da taxa de crescimento populacional aliado à instabilidade das condições climáticas, espera-se que a quantidade de água doce disponível reduza drasticamente, o que impactará de maneira negativa o desenvolvimento socioeconômico de muitos países. Dessa forma, a remediação e a reutilização de águas residuais surgem como possíveis estratégias para aumentar os recursos hídricos, caso possam ser gerenciadas com segurança³.

1. Faculdade UnB - Planaltina, Universidade de Brasília, Brasil

Não obstante à questão da disponibilidade, um problema ambiental concorrente e mais complexo é a contaminação dos recursos hídricos devido à presença de poluentes. As regiões de intensa atividade industrial são muito mais afetadas, devido ao despejo inadequado de efluentes contendo poluentes de alta periculosidade, que penetram no solo ou são liberados em rios e lagos próximos a instalações industriais. Paralelamente, vazamentos de tubulações e de tanques de armazenamento subterrâneos, assim como minas e aterros abandonados, também introduzem diversos tipos de poluentes no ambiente. Os contaminantes mais comuns dessas atividades são metais tóxicos (mercúrio, cromo, chumbo, arsênio, cádmio, resíduos radioativos), compostos orgânicos recalcitrantes ou persistentes (corantes químicos, pesticidas, herbicidas, solventes clorados, dioxinas) e compostos orgânicos voláteis derivados de petróleo (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno). Além das águas residuais e dos lençóis freáticos, a contaminação da água de consumo humano tem sido motivo de grande preocupação. A presença de metais tóxicos, como arsênio e mercúrio em particular, além de corantes químicos, resíduos farmacêuticos, solventes orgânicos e micro-organismos patogênicos, representa sérios riscos à saúde humana. O problema maior é que os processos convencionais de tratamento de água usualmente empregados nas estações não são capazes de remover adequadamente esse amplo espectro de produtos químicos tóxicos e micro-organismos patogênicos⁴.

Nesse cenário desafiador, nanotecnologias inovadoras têm oferecido oportunidades sem precedentes, não somente para o desenvolvimento de processos mais rápidos, econômicos e eficazes de monitoramento e remediação de águas contaminadas, mas também para a gestão de águas residuais e dessalinização⁵. Com efeito, a manipulação da matéria em nanoescala permite criar e usar estruturas, dispositivos e sistemas com propriedades e funções extraordinárias, particularmente importantes no contexto do tratamento de águas contaminadas. Essas nanotecnologias impactam tanto o aumento da eficiência dos processos, quanto a redução da quantidade de resíduos gerados e de substâncias químicas nocivas empregadas.

2. Algumas soluções nanotecnológicas atuais para descontaminação de águas

No caso da descontaminação de águas, os principais materiais e processos atualmente empregados estão listados na Tabela 1. A exploração das funcionalidades dos nanomateriais permite o desenvolvimento de operações unitárias mais eficientes no processo de remediação de águas, comparado aos métodos tradicionais⁶.

Tabela 1. Principais materiais e processos envolvidos nas nanotecnologias para descontaminação de águas

Materiais	Processos
Nanomateriais carbonáceos	Adsorção
Nanozeólitas	Nanofiltração e dessalinização
Dendrímeros	Nanofotocatálise
Nanopartículas metálicas e de óxidos metálicos	Nanoeletrocatalise Decomposição por oxirredução

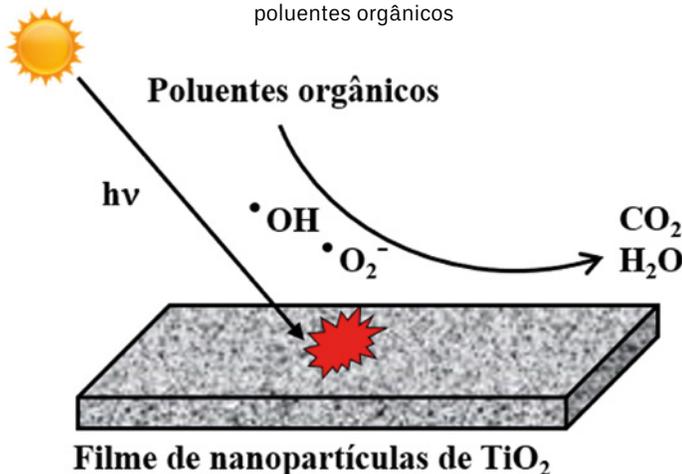
Fonte: elaborada pelo autor.

O uso de nanomateriais tem impulsionado o desenvolvimento de membranas mais eficientes e economicamente viáveis para tratamento de água de consumo por **dessalinização** e **nanofiltração**. Membranas nanoestruturadas compostas de zeólitas, dendrímeros ou óxidos metálicos, como TiO_2 (dióxido de titânio), SiO_2 (dióxido de silício) e Al_2O_3 (óxido de alumínio), têm demonstrado excelentes características de rejeição iônica, resistência mecânica e permeabilidade, permitindo-se alcançar altos fluxos de água dessalinizada⁷⁻⁹. Na mesma direção, o

uso de nanomateriais carbonáceos, como nanotubos de carbono e nanopartículas de fulerenos, em membranas de nanofiltração promove ainda a inativação de bactérias¹⁰. Filtros de água preparados com espuma de poliuretano revestida com fibras de nanopartículas metálicas, como as de prata (Ag), apresentam propriedades antibacterianas contra *Escherichia coli* (*E. coli*)¹¹.

No que diz respeito à **nanofotocatálise** de poluentes, nanopartículas de TiO_2 , suportadas em materiais como fibra de vidro, promovem a degradação, sob radiação ultravioleta, de compostos orgânicos presentes em águas residuais, gerando produtos menos tóxicos ou atóxicos (**Figura 1**). No processo, geralmente são produzidas espécies reativas de oxigênio, como os radicais hidroxila ($\text{HO}\cdot$) e superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), sem a necessidade de introdução de reagentes químicos. Esses radicais, além de decomporem os poluentes orgânicos, desinfetam a água matando micro-organismos como fungos, algas, bactérias e protozoários^{12,13}.

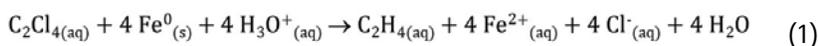
Figura 1: Aplicação da nanofotocatálise para a degradação de poluentes orgânicos



Fonte: elaborada pelo autor.

Além da decomposição por fotocatalise, nanomateriais permitem a degradação eletrocatalítica de poluentes em água (**nanoeletrocatalise**). Materiais como filmes finos de nanopartículas de ZnO (óxido de zinco), depositadas sobre vidro revestido de óxido de estanho dopado com flúor, atuam como eletrodos catalíticos para a degradação de corantes têxteis em efluentes industriais¹⁴. Ainda, eletrodos de grafite suportados com nanopartículas de TiO₂ e CuO (óxido de cobre (II)) têm demonstrado grande potencial de oxidação eletrocatalítica de poluentes orgânicos de águas residuais¹⁵.

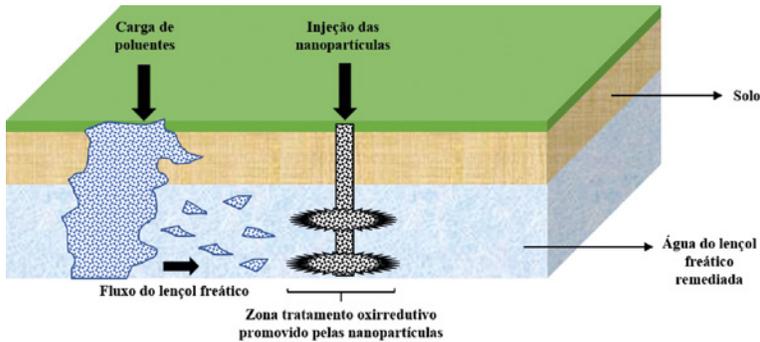
Com relação à água presente no solo e em lençóis freáticos, soluções nanotecnológicas têm sido empregadas *in situ* para a **decomposição por oxirredução** de poluentes orgânicos e inorgânicos. Diferentemente da nanofotocatalise e da nanoeletrocatalise, nesse processo, os nanomateriais atuam como agentes oxidantes ou redutores, e não como catalisadores, para a degradação do poluente. Esse é caso da utilização de nanopartículas de ferro zero-valente (ou ferro metálico) que, devido ao seu forte poder redutor para um amplo espectro de substâncias tóxicas, são altamente aplicáveis na descontaminação de águas subterrâneas¹⁶. O processo é baseado na oxidação do ferro metálico (Fe⁰), que atua como agente redutor na degradação de compostos nocivos, por exemplo, o tetracloroeteno (C₂Cl₄), de acordo com a equação química a seguir.



O tamanho diminuto das nanopartículas de ferro zero-valente permite que sejam muito móveis, e possam ser efetivamente transportadas pelo fluxo de água subterrânea. No processo *in situ* mais comumente usado, uma lama contendo nanopartículas de ferro zero-valente é injetada na área contaminada onde a remediação é necessária, formando-se uma zona de tratamento (**Figura 2**). O fluxo natural do lençol freático promove o contato entre as nanopartículas e os poluentes, onde ocorre o processo oxirredutivo para destruir ou imobilizar os contaminantes. Estudos mostram que as nanopartículas praticamente não são alte-

radas pela acidez do solo, temperatura ou níveis de nutrientes, de forma que podem permanecer na zona de tratamento mantendo suas propriedades por longos períodos¹⁷.

Figura 2: Emprego de nanopartículas de ferro zero-valente para descontaminação *in situ* de águas subterrâneas



Fonte: elaborada pelo autor.

Todas as nanotecnologias de descontaminação de águas têm suas vantagens e desvantagens, de forma que não é possível se eleger um processo de uso universal, devido à necessidade de se avaliar o tipo de poluente presente e a característica da água a ser tratada em cada caso. Todavia, para a remediação de águas residuais de origem industrial, as técnicas baseadas em **adsorção** utilizando nanomateriais, chamados de nanoadsorventes, são frequentemente consideradas superiores em relação às demais, não apenas em efetividade, mas principalmente em termos de custo-benefício, facilidade de operação e simplicidade de *design*¹⁸. Nesse contexto, no presente capítulo, será dado um enfoque mais aprofundado sobre esse tema, em que serão discutidos o processo de adsorção, sua aplicação na remoção de poluentes de águas residuais, o diferencial dos adsorventes em nanoescala atualmente empregados e seus tipos.

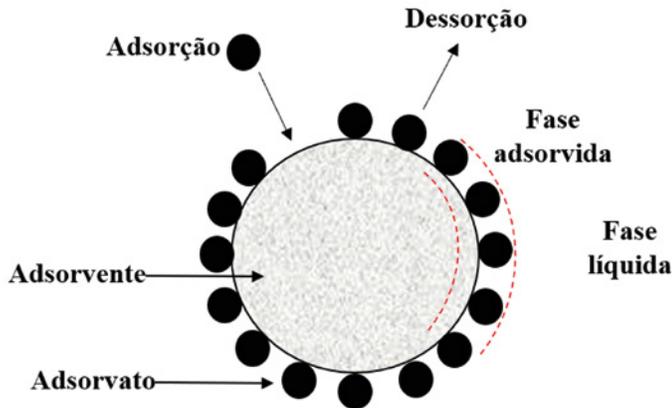
3. Descontaminação de água por nanoadsorventes

3.1. Processo de adsorção e vantagens do confinamento à nanoescala

De uma maneira geral, pode-se conceituar adsorção como o processo de acumulação de espécies químicas de uma fase fluida (adsorvato) na superfície de um líquido ou um de sólido (adsorvente)¹⁹. Em processos reversíveis, o adsorvato pode ainda desligar-se da superfície, fenômeno denominado dessorção (**Figura 3**). Os processos de adsorção envolvem uma série de fenômenos que podem alterar a distribuição de moléculas e/ou íons na interface adsorvente/adsorvato (fase adsorvida). Os efeitos podem ser complexos, dadas a diversidade e as propriedades das espécies químicas presentes.

Com base na natureza e na magnitude das forças de interação entre o adsorvato e o adsorvente, os processos de adsorção podem ser subdivididos em dois tipos principais:

- **adsorção física ou fisissorção:** resultante de interações fracas e reversíveis do tipo forças de London, dipolo-dipolo, interações hidrofóbicas, ligação de hidrogênio e forças íon-dipolo; e
- **adsorção química ou quimissorção:** resultante de interações fortes e quase sempre irreversíveis, com formação de ligações químicas do tipo iônica ou principalmente covalente.

Figura 3: Representação esquemática do processo de adsorção

Fonte: elaborada pelo autor.

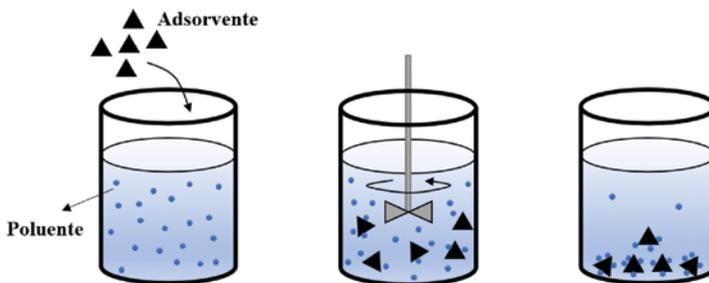
Se por um lado na fisissorção o adsorvato pode se ligar em toda a extensão da superfície, inclusive formando camadas, por outro lado, na quimissorção a ligação se dá exclusivamente em determinados sítios, denominados sítios ativos, que são específicos para determinado adsorvato. Contudo, dependendo da natureza/estrutura do adsorvente e do adsorvato, há possibilidade de adsorção com características física e química ao mesmo tempo²⁰. No contexto da remediação de águas contaminadas, é desejável que o processo de adsorção seja rápido e reversível, para tornar viável a recuperação do poluente e do adsorvente, visando à sua reutilização.

Para se avaliar a performance de adsorção e outras informações relevantes acerca do processo, por exemplo, seu mecanismo, são efetuados experimentos de equilíbrio de adsorção em batelada, sob temperatura constante (**Figura 4**). No caso da remoção de poluentes por adsorventes sólidos, determinada massa de adsorvente (m) é adicionada a certo volume (V) de soluções padrões do contaminante com diferentes concentrações iniciais (C_0), sob agitação, geralmente feita com sistema mecânico, orbital ou magnético. Alcançado o tempo de equilíbrio, o adsorvente carregado com o poluente é separado do meio por um processo secundário, como sedimentação, centrifugação, coa-

gulação/floculação ou flotação. Finalmente, uma amostra da solução remediada é coletada para determinação da concentração de poluente remanescente (C_e). Dependendo da natureza química do contaminante, essa concentração pode ser determinada por meio de técnicas como cromatografia (poluentes orgânicos em geral), espectroscopia UV-VIS (corantes, fármacos) e espectroscopia de absorção/emissão atômica (metais tóxicos). A capacidade de adsorção no equilíbrio (q_e) pode ser, então, calculada por meio da equação a seguir:

$$q_e = \frac{(C_0 - C_e)}{m} V \quad (2)$$

Figura 4: Esquema do experimento de equilíbrio de adsorção em batelada



Fonte: elaborada pelo autor.

A partir dos resultados dos experimentos de batelada, são utilizados modelos de isotermas de adsorção não lineares para se ajustar a curva de capacidade de adsorção em função da concentração de equilíbrio do poluente (q_e vs C_e). Com isso, podem-se extrair informações fundamentais de avaliação de performance, como capacidade máxima de adsorção, intensidade/energia de adsorção, afinidade do adsorvente pelo poluente, entre outras. Para remoção de poluentes presentes em meio líquido utilizando adsorventes sólidos, os modelos de isoterma mais empregados são os de *Langmuir*²¹ e de *Freundlich*²². A Tabela 2 lista as principais características de cada um desses modelos e o signi-

ficado físico-químico de seus parâmetros, enquanto a Figura 5 mostra o perfil gráfico das isotermas.

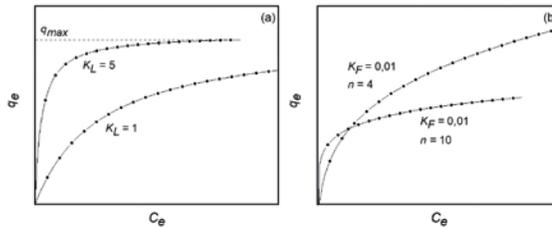
Tabela 2. Principais modelos não lineares de isotermas de adsorção e suas características

Modelo	Equação	Características	Parâmetros
Langmuir	$q_e = \frac{q_{max} K_L C_e}{1 + K_L C_e}$	<p>Adsorção em monocamada</p> <p>Sítios de adsorção equivalentes</p> <p>Não há interações entre espécies do adsorvato em sítios adjacentes</p>	<p>q_{max} (capacidade máxima de adsorção)</p> <p>K_L (constante de <i>Langmuir</i>, relacionada à energia de adsorção)</p>
Freundlich	$q_e = K_F C_e^{1/n}$	<p>Adsorção em multicamadas</p> <p>Superfície com distribuição heterogênea de sítios de adsorção</p>	<p>K_F (constante de <i>Freundlich</i>, relacionada à capacidade de adsorção)</p> <p>$1/n$ (fator de heterogeneidade, relacionado à energia de adsorção)</p>

Fonte: elaborada pelo autor.

No caso do formalismo de *Langmuir*, como o modelo pressupõe adsorção em uma única camada, quando todos os sítios superficiais são ocupados pelas espécies do poluente no processo de adsorção, q_e torna-se constante e igual a q_{max} . A partir do valor de q_{max} , usualmente expresso em miligramas de poluente por grama de adsorvente, são planejadas as quantidades de adsorvente para remediar determinado volume de água contaminada. O valor da constante de *Langmuir* fornece informações sobre a afinidade do poluente pelo adsorvente, uma vez que está associada à energia de interação adsorvente-poluente e, portanto, quanto mais elevado o valor de K_L , mais adsorvente é a superfície. Na prática, os valores da constante de *Langmuir* são úteis para se comparar a performance de adsorção de um mesmo adsorvente para diferentes poluentes (quanto maior K_L , maior a afinidade por determinado poluente) ou a adsorção de um poluente por diferentes adsorventes (quanto maior K_L , maior a eficiência do adsorvente).

Figura 5: Comparação do perfil das isotermas de *Langmuir* (a) e *Freundlich* (b). Para fins didáticos, as unidades dos parâmetros de cada modelo foram omitidas



Fonte: elaborada pelo autor.

Quando os resultados dos experimentos de adsorção exibem melhor adequação ao formalismo de *Freundlich*, infere-se que o processo de adsorção ocorre em múltiplas camadas. Isso implica que a superfície do adsorvente é heterogênea, em que existem vários tipos de sítios de adsorção, com energias distintas. De forma geral, valores de n entre 1 e 10 ($1/n \leq 1$) indicam uma adsorção favorável, e quanto maior o valor de n , menos heterogênea é a distribuição de sítios de adsorção e mais forte é a interação entre o adsorvente e o poluente²³. O valor da constante de *Freundlich* é proporcional à capacidade de adsorção e pode ser usado para se avaliar a eficiência de adsorção de um adsorvente por diferentes poluentes (quanto maior K_F , maior a eficiência do adsorvente). Diferentemente do formalismo de *Langmuir*, o modelo de isoterma de *Freundlich* não prevê explicitamente um parâmetro para se determinar a capacidade máxima de adsorção, visto que o processo ocorre em multicamadas. Para se exprimir um valor de q_{max} a partir desse modelo, é necessário realizar experimentos de adsorção em batelada, mantendo-se constante a concentração inicial de poluente e variando-se a massa de adsorvente. Dessa forma, no limite em que C_e tende à C_0 , q_e tende à q_{max} ²⁴.

Diversos fatores influenciam o processo de adsorção, entre os quais podem se citar o pH, a rapidez de agitação, a temperatura e o tempo de contato entre o adsorvente e o adsorvato. Porém, o fator mais impor-

tante é a área superficial disponível para a adsorção. Nesse sentido, os nanomateriais apresentam duas propriedades essenciais que os tornam particularmente atraentes como adsorventes. A primeira delas é a grande relação superfície/volume, o que lhes confere uma enorme superfície específica (área por massa), quando comparada à dos adsorventes em escala macroscópica (usualmente denominada escala *bulk*). Em decorrência, os nanoadsorventes apresentam uma maior capacidade de adsorção, assim como uma superfície mais reativa²⁵. Uma outra propriedade importante é o fato de que as nanopartículas também podem ser eficientemente funcionalizadas com vários grupos químicos para aumentar sua afinidade em relação aos poluentes-alvo. Dessa forma, é possível desenvolver uma ampla variedade de nanoadsorventes, não somente com elevada capacidade de adsorção, mas, principalmente, com alta seletividade para o contaminante a ser removido²⁶.

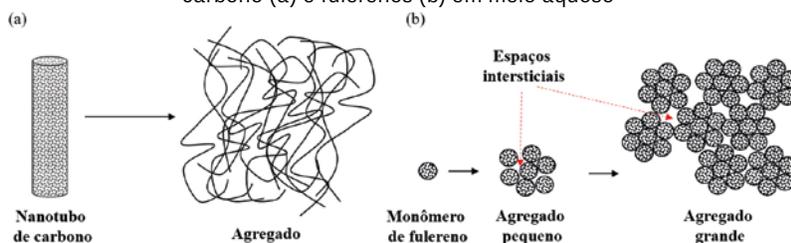
3.2. Alguns nanoadsorventes convencionais utilizados na descontaminação de águas

Para fins didáticos, denominam-se como nanoadsorventes “convencionais” aqueles que apresentam apenas o confinamento à escala nanométrica como seu diferencial de aplicação, a despeito de outras propriedades extraordinárias, por exemplo, termorresponsividade e magnetismo. Os nanoadsorventes convencionais mais importantes empregados atualmente para descontaminação de águas residuais de origem industrial podem ser enquadrados em três grandes grupos: materiais carbonáceos, zeólitas e dendrímeros. Todavia, também é possível combinar esses materiais entre si e com outros, como metais e óxidos metálicos, originando nanoadsorventes híbridos.

Com respeito aos materiais carbonáceos, os mais utilizados são nanotubos de carbono, nanofibras de carvão ativado, fulerenos e grafeno e seus derivados. Nanotubos de carbono mostram desempenho destacado na adsorção de contaminantes orgânicos devido à hidrofobicidade de sua superfície gráfica⁶. Na fase aquosa, esses nanomateriais formam agregados isolados que, apesar de acarretarem redução de

área superficial efetiva, apresentam espaços intersticiais e sulcos com sítios de alta energia de adsorção para moléculas orgânicas²⁷. Esse fenômeno também ocorre com fulerenos, em que a redução de área superficial é ainda mais pronunciada²⁸ (**Figura 6**).

Figura 6: Esquema do processo de agregação de nanotubos de carbono (a) e fulerenos (b) em meio aquoso

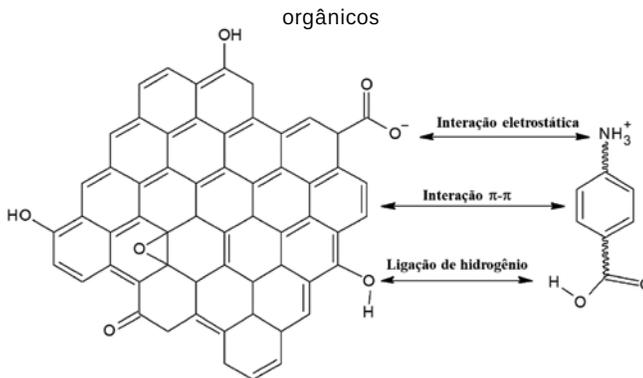


Fonte: elaborada pelo autor.

O carvão ativado nanoestruturado também apresenta grande afinidade por uma ampla variedade de poluentes orgânicos, sobretudo devido à formação de interações hidrofóbicas. Deve-se destacar, entretanto, que esses nanomateriais possuem significativo número de microporos inacessíveis a moléculas orgânicas volumosas, como muitos fármacos²⁹. Somando-se a isso, são pouco eficientes na adsorção de poluentes orgânicos polares e de baixa massa molecular, mesmo tendo superfície específica comparável à dos nanotubos de carbono. Para esses tipos de poluentes, são empregados fulerenos, óxidos de grafeno e nanotubos de carbono que, por serem doadores de elétrons π , têm a capacidade de realizar interações π - π com moléculas orgânicas contendo ligações C=C, que podem ser tanto de natureza apolar (hidrocarbonetos aromáticos) quanto polar (compostos aromáticos polares)³⁰. Compostos orgânicos com grupos funcionais fortemente polares como carboxila ($-\text{COOH}$), hidroxila ($-\text{OH}$) e amino ($-\text{NH}_2$) também podem ser removidos com esses tipos de nanoadsorventes, devido à formação de ligações de hidrogênio com sua superfície grafítica doadora de elétrons³¹. Óxidos de grafeno possuem grupos carboxila na superfície, que podem ser desprotonados em pH adequado, gerando grupos carboxilatos ($-\text{COO}^-$).

Dessa forma, esses nanoadsorventes podem formar interações eletrostáticas com poluentes orgânicos carregados positivamente, entre eles alguns corantes e fármacos, além de metais tóxicos como Cu(II), Zn(II), Cd(II) e Pb(II)^{6,29} (**Figura 7**).

Figura 7: Possíveis interações entre óxido de grafeno e poluentes orgânicos

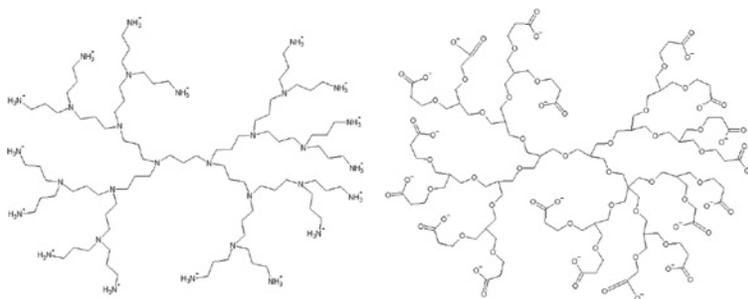


Fonte: elaborada pelo autor.

No que concerne às zeólitas nanoestruturadas, esses materiais encontram um campo maior de aplicação na fabricação de membranas para filtração e dessalinização de água. Todavia, nanopartículas de zeólitas têm demonstrado propriedades adsorptivas excepcionais, especialmente para a remoção de metais tóxicos (Cr(III), Ni(II), Cu(II), Zn(II) e Cd(II)) de águas residuais³². Devido à sua estrutura altamente microporosa, apresentam cavidades de dimensões moleculares, onde se formam canais interligados, os quais são preenchidos principalmente com água e íons permutáveis, entre eles Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} . Isso lhes confere alta capacidade de troca iônica e seletividade. Esses nanomateriais podem ser preparados a partir de zeólitas naturais ou sintéticas, geralmente por processos hidrotermais³³ ou por fragmentação induzida por laser³⁴. Aplicações mais recentes das nanozeólitas incluem a remoção de resíduos aquosos radioativos de césio-137 ($^{137}\text{Cs}^+$) de usinas nucleares³⁵ e a remoção de cromo hexavalente (Cr(VI)) de efluentes de indústrias de curtume³⁶. Além de metais tóxicos, as nanozeólitas têm sido empregadas para a remoção de compostos orgânicos polares, como corantes³⁷ e fármacos³⁸, de águas residuais.

Assim como no caso das nanozeólitas, o emprego de dendrímeros na descontaminação de água está mais relacionado às nanotecnologias de filtração e dessalinização²⁶ do que aos processos de adsorção. Dendrímeros são macromoléculas sintéticas, complexas e organizadas, com estrutura tridimensional regular, compreendendo um núcleo de onde se irradiam cadeias poliméricas altamente ramificadas com terminações contendo grupos funcionais bem definidos³⁹. Sua forma mais usual é a esférica, mas também estão disponíveis como cones e discos, geralmente na faixa de tamanho de 2 nm a 20 nm⁴⁰. Com sua estrutura particular, dendrímeros têm grande potencial como nanoadsorventes para remoção de poluentes orgânicos e metais tóxicos de águas residuais. De fato, eles podem, por exemplo, ser modelados com cadeias poliméricas internas hidrofóbicas, para a adsorção de compostos orgânicos, e extremidades contendo grupos funcionais carregados para adsorção de metais tóxicos por interação eletrostática (**Figura 8**). O *design* da estrutura dos dendrímeros pode ainda prever processos adsorptivos baseados em complexação e ligações de hidrogênio⁴¹. Dendrímeros já estão sendo empregados como nanoadsorventes efetivos na remoção de corantes têxteis⁴² e metais tóxicos⁴³ (Ni(II), Hg(II) e Pb(II)) de águas residuais. As maiores limitações dessa nanotecnologia são a alta complexidade e o custo de produção dos nanopolímeros, que ainda precisam ser melhorados⁴⁴.

Figura 8: Exemplos de dendrímeros modelados com cadeias internas hidrofóbicas e extremidades carregadas



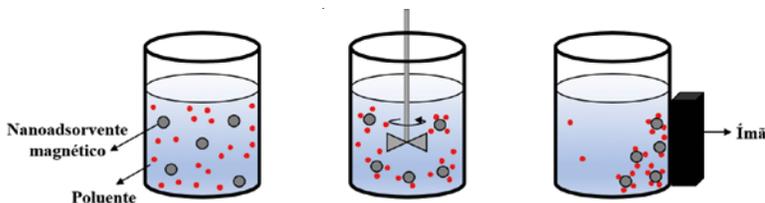
Fonte: elaborada pelo autor.

4. Nanoadsorventes magnéticos: uma tendência nanotecnológica emergente

4.1. Características gerais e propriedades dos nanoadsorventes magnéticos

Por combinarem as vantagens do confinamento à escala nanométrica com a possibilidade de manipulação magnética, os nanoadsorventes magnéticos são categorizados separadamente de outros nanoadsorventes⁴⁵. As principais operações unitárias envolvidas na remediação de águas contaminadas empregando-se adsorventes são a adsorção propriamente dita e a separação da fase adsorvente-poluento do meio, geralmente feita por sedimentação, centrifugação, coagulação-floculação ou flotação. Com os nanoadsorventes magnéticos, o processo de separação é realizado por meio da aplicação de um campo magnético externo (**Figura 9**). Nesse contexto, o uso desses nanoadsorventes representa um importante diferencial, pois a separação química assistida magneticamente da fase nanoadsorvente-poluento é muito mais eficiente, por ser mais rápida e segura, além de gerar menos resíduos. Com efeito, esse processo permite a remediação de grandes volumes de efluente em um tempo bem mais curto, evita que os nanoadsorventes sejam liberados e contaminem as águas residuais tratadas, e minimiza a geração de lodo secundário⁴⁶.

Figura 9: Esquema do processo de separação química de poluentes

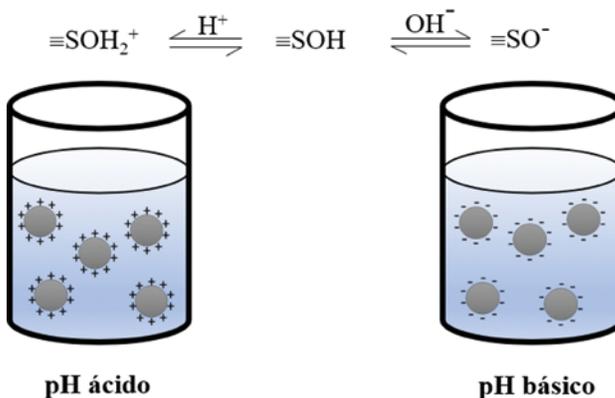


Fonte: elaborada pelo autor.

Os nanoadsorventes magnéticos mais comumente utilizados para descontaminação de águas residuais de origem industrial são baseados em nanopartículas de óxidos de ferro, magnetita (Fe_3O_4) e maghemita ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), além de outras ferritas (MFe_2O_4 ; M = Mg, Mn, Co, Ni, Cu e Zn) e nanopartículas *core-shell* bimagnéticas ($\text{MFe}_2\text{O}_4@ \gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$)⁴⁷⁻⁵⁰. Esses nanomateriais apresentam tamanhos típicos da ordem de 10 nm, elevada área superficial, grande quantidade de sítios superficiais ativos, boa dispersão em água e alta estabilidade química. Além disso, seu custo de preparação é baixo, sendo os métodos hidrotérmico e sol-gel os mais empregados⁵¹.

Com relação às propriedades magnéticas, as curvas de magnetização típicas desses nanoadsorventes não apresentam histerese, e as magnetizações remanentes e os campos coercivos possuem valores nulos, indicando um comportamento superparamagnético. Os valores de magnetização de saturação típicos são da ordem de 50 emu/g a 80 emu/g, suficientemente altos para permitir uma separação magnética empregando-se ímãs comuns.

Figura 10: Os sítios metálicos superficiais anfotéricos $\equiv\text{SOH}$ das nanopartículas de ferrita são protonados em meio ácido, gerando carga superficial positiva $\equiv\text{SOH}_2^+$ e desprotonados em meio básico, gerando carga superficial negativa $\equiv\text{SO}^-$



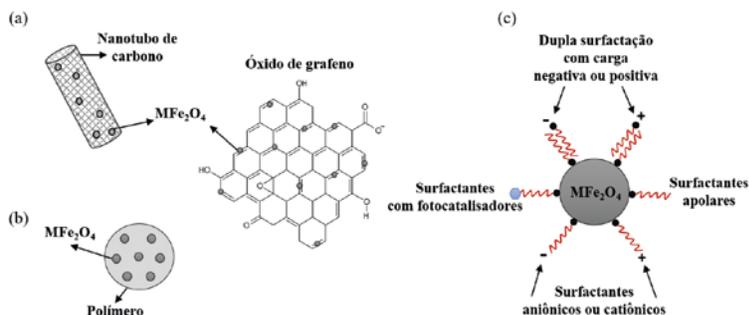
Fonte: elaborada pelo autor.

Quando nanopartículas de ferrita são dispersas em água, sua superfície passa a apresentar propriedades ácido-base, devido à formação de sítios metálicos anfotéricos ($\equiv\text{SOH}$; em que S corresponde a um cátion metálico superficial). Dessa forma, esses sítios podem ser protonados em meio ácido ($\equiv\text{SOH}_2^+$) ou desprotonados em meio básico ($\equiv\text{SO}^-$), gerando carga positiva ou negativa na superfície da nanopartícula, respectivamente⁵² (**Figura 10**). Essa característica torna os nanoadsorventes magnéticos particularmente importantes para a remoção de metais tóxicos por interação eletrostática. Metais como Cr(VI), As(V), Mo(VI), que se especiam na forma de oxiânions, têm sido eficientemente removidos de águas residuais em pH ácido utilizando nanoadsorventes magnéticos^{53,54}.

4.2. Design de nanoadsorventes magnéticos multifuncionais

As ferritas nanoestruturadas, graças, principalmente, à sua elevada reatividade de superfície associada à possibilidade de controle de tamanho no processo de preparação, são materiais de grande versatilidade e podem servir de precursores para o *design* de nanoadsorventes magnéticos multifuncionais. Esses nanomateriais híbridos combinam diversas propriedades e funções importantes para a remediação de águas em um único objeto: a ferrita confere a característica magnética para permitir a separação, enquanto outros componentes são responsáveis pelas propriedades adsorptivas de interesse⁶ (**Figura 11**).

Figura 11: Nanoadsorventes magnéticos multifuncionais para descontaminação de águas. As nanopartículas superparamagnéticas de ferrita permitem a separação química assistida magneticamente, enquanto materiais carbonáceos (a), matrizes poliméricas (b) e diversos tipos distintos de surfactantes (c) conferem ao nanomaterial as propriedades adsortivas de interesse



Fonte: elaborada pelo autor.

No caso dos híbridos elaborados com materiais carbonáceos, uma das principais propriedades de interesse é sua enorme superfície específica, geralmente superior a $2.000 \text{ m}^2/\text{g}$. Com isso, tem-se reportado que a incorporação de nanopartículas de ferrita de manganês e de cobalto em óxido de grafeno e nanotubos de carbono permite uma eficiência muito maior na remoção de metais tóxicos de águas residuais como As(III) , As(V) , Pb(II) e Hg(II) , quando comparada ao uso de nanopartículas de ferrita isoladas^{55,56}. Outra funcionalidade importante dos híbridos magnéticos à base de materiais carbonáceos é a característica não polar de sua superfície, em geral. Dessa forma, nanotubos de carbono decorados com ferrita de níquel têm obtido uma excelente performance na remediação de águas contaminadas com poluentes orgânicos, sobretudo corantes têxteis de cadeias carbônicas longas⁵⁷.

Nanomateriais carbonáceos magnéticos híbridos também têm sido empregados para a produção de nanorrobôs, conhecidos como *nano-bots*, visando capturar metais tóxicos de soluções contaminadas e transportá-los para locais desejados e até mesmo liberá-los⁵⁸. Essas

nanomáquinas autoalimentadas são revestidas com grafeno dopado com nanopartículas magnéticas e movidos a peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A decomposição do peróxido, com liberação de oxigênio, funciona como o propulsor do *nanobot*, que tem seu movimento controlado por um campo magnético variável e muito preciso. Dessa forma, eles podem adsorver os poluentes, serem guiados para um ponto de coleta e continuarem sua “tarefa” de descontaminação.

Com respeito à incorporação de nanopartículas magnéticas em matrizes poliméricas, biopolímeros como a quitosana têm sido decorados com ferrita de manganês para a remoção de metais tóxicos, como Cr(VI) e Cu(II)⁵⁹. Além da vantagem da grande superfície específica trazida pelas cadeias poliméricas, a quitosana tem diversos grupos amino que, em pH ácido, são protonados ($-\text{NH}_3^+$) e podem adsorver os metais tóxicos por interação eletrostática. Outra vantagem importante é o fato de a quitosana ser um biopolímero, o que torna o nanoadsorvente híbrido ambientalmente sustentável.

Os nanoadsorventes magnéticos multifuncionais mais versáteis são aqueles elaborados com estrutura *core-shell*, ou núcleo-casca, na qual o núcleo é composto por uma ferrita de interesse e a casca corresponde tipicamente a um surfactante que apresenta afinidade por determinado poluente-alvo. Com base nas propriedades ácido-base da superfície das ferritas, surfactantes com grupos carregados ($-\text{COO}^-$, $-\text{SO}_3^-$, $-\text{NH}_3^+$, $-\text{NR}_3^+$) podem ser utilizados em pH adequado para funcionalizar diretamente as nanopartículas, processo que ocorre por meio de ligações iônicas. Para outros surfactantes, muitas vezes, é realizado um recobrimento prévio da superfície da ferrita com sílica, que, devido à formação de grupos silanol ($\equiv\text{SiOH}$), permite uma funcionalização não somente por ligação iônica, mas, sobretudo, por ligação covalente⁶.

As múltiplas possibilidades de *design* desses nanoadsorventes com estrutura *core-shell* permitem a remediação de águas contaminadas com todas as classes de poluentes. A escolha do surfactante é feita com base no tipo de poluente-alvo que se deseja adsorver. Surfac-

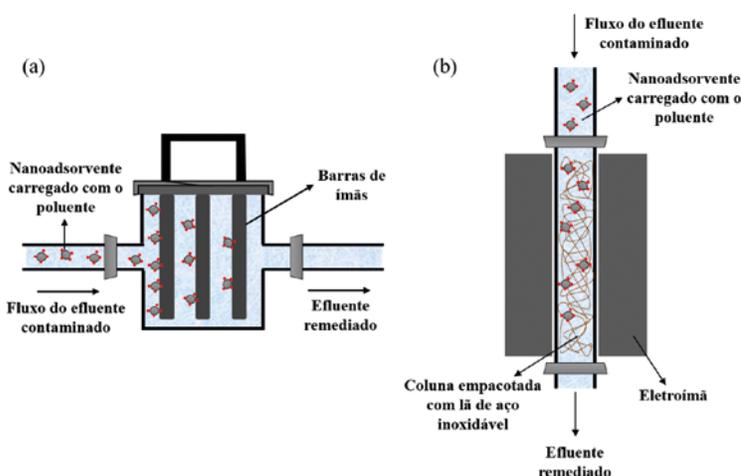
tantes com cadeias carbônicas longas, como ácido esteárico, brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB) e polidimetilsiloxano (PDMS), são apropriados para a remoção de pesticidas⁶⁰ e compostos petroquímicos^{61–63}, devido à formação de interações hidrofóbicas com os poluentes. Surfactantes carregados, como o CTAB, quando utilizados em dupla camada de surfactação, oferecem a vantagem da formação de interações tanto hidrofóbicas quanto iônicas. Com isso, podem ser utilizados para remoção de metais tóxicos e de compostos orgânicos carregados, como a maioria dos corantes têxteis^{64–66}. Ligantes como ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido dimercaptosuccínico (DMSA) podem ser suportados em nanopartículas recobertas com sílica para serem utilizados como agentes quelantes na remoção de metais tóxicos como Pb(II), Cd(II) e Hg(II)^{66,67}. Surfactantes com propriedades fotocatalíticas adicionam uma propriedade extra aos nanoadsorventes magnéticos: a possibilidade de degradação do poluente sob radiação ultravioleta. Isso tem sido alcançado empregando-se surfactantes à base de compostos organometálicos de platina e matrizes poliméricas com TiO₂ para a adsorção, separação magnética e fotodegradação de corantes e pesticidas^{45,68}.

4.3. Principais tipos de separadores magnéticos

Independentemente da capacidade de adsorção dos nanoadsorventes magnéticos, o controle eficiente da etapa de separação química assistida magneticamente é essencial para o desempenho global do processo de descontaminação. Nos processos adaptados à escala industrial, podem ser empregadas duas classes principais de separadores magnéticos, que são baseados fundamentalmente no tipo de ímã utilizado em sua construção (**Figura 12**). Nos separadores de fluxo contínuo, usam-se ímãs permanentes, geralmente feitos à base de ferro, níquel, cobalto ou de terras raras (Nd-Fe-B), que geram campos de intensidade de até 1 T. No processo, após a etapa de adsorção, o efluente atravessa o separador magnético, no qual a fase nanoadsorvente-poluente fica retida nos ímãs, enquanto o efluente remediado segue para ser reaproveitado. A disposição de vários separadores em série promove o aumento da eficiência de separação. Os separadores de fluxo contínuo

são considerados de baixo custo, já que nenhuma eletricidade precisa ser utilizada para geração de campo magnético⁶⁹. Mais recentemente, o uso de ímãs permanentes multipolares tem apresentado vantagens consideráveis, pois pode gerar campos de intensidade superior a 2 T por unidade de comprimento⁷⁰.

Figura 12: Esquemas dos tipos principais de separadores magnéticos empregados em descontaminação de águas utilizando nanoadsorventes magnéticos: (a) separador de fluxo contínuo e (b) separador de coluna



Fonte: elaborada pelo autor.

No caso dos separadores magnéticos baseados em colunas, comumente se utilizam eletroímãs em vez de ímãs permanentes. O sistema consiste geralmente de uma coluna, preenchida com um emaranhado de lã de aço inoxidável, que é colocada no interior de um eletroímã. Quando o eletroímã é acionado, os fios da lã de aço, devido à sua susceptibilidade magnética, criam inhomogeneidades no campo magnético gerado por meio da coluna, de forma que um gradiente de campo é produzido em suas adjacências. Então, os nanoadsorventes magnéticos carregados com os poluentes são fortemente atraídos pelos fios da lã de aço e ficam aderidos à sua superfície, permitindo a

passagem do efluente livre de poluentes⁷¹. Esse processo, conhecido como separação magnética de alto gradiente, permite a geração de campos magnéticos com gradientes superiores a 10^4 T/m, produzindo forças intensas o suficiente para capturar nanopartículas magnéticas em fluxos de efluentes com elevada vazão⁷².

4.4. Recuperação e reúso de nanoadsorventes magnéticos

A capacidade de regeneração é um dos fatores que mais afeta a relação custo-benefício do uso de nanoadsorventes para descontaminação de águas residuais. No caso dos nanoadsorventes magnéticos, as técnicas de dessorção dos contaminantes, e posterior recuperação dos nanomateriais, dependem fundamentalmente do tipo de poluente adsorvido. Com relação aos metais tóxicos e compostos orgânicos carregados, a recuperação dos nanoadsorventes é realizada por controle de pH, a partir de lavagens do material da fase nanoadsorvente-poluente com soluções diluídas de ácidos/bases. O princípio básico do procedimento se baseia na neutralização de grupos químicos eletricamente carregados, por meio de sua protonação/desprotonação. Isso diminui fortemente a interação eletrostática entre os sítios ativos do nanoadsorvente e os poluentes, permitindo sua dessorção. Em muitos casos, esse processo permite uma recuperação superior a 90%, preservando-se a estrutura e a capacidade de adsorção do nanomaterial^{73,74}. Para poluentes orgânicos pouco polares e de baixa volatilidade, o processo de dessorção geralmente é feito por extração utilizando solventes, enquanto que para compostos orgânicos voláteis usam-se ciclos de aquecimento em fornos especiais⁷⁵. Recentemente, uma estratégia inovadora de recuperação foi proposta com base no comportamento termomagnético dos nanoadsorventes magnéticos⁶³. Ciclos de experimentos de magneto-hipertermia foram empregados para dessorção de tolueno carregado em nanopartículas de ferrita funcionalizada com PDMS. No processo, a aplicação de campo magnético alternado promove o aquecimento local do nanoadsorvente a temperaturas próximas a 75 °C, promovendo a volatilização do tolueno. Dessa forma, é possível recuperar tanto o nanoadsorvente, quanto o poluente.

5. Nanotecnologias para descontaminação de águas: riscos ou desafios?

Não restam dúvidas de que as nanotecnologias representam uma revolução na proposição de estratégias inovadoras para descontaminação de águas. Entretanto, não se pode deixar de destacar que, juntamente com a introdução de novos materiais e processos, as nanotecnologias trazem uma preocupação crescente quanto aos riscos potenciais de danos ao ambiente. Os nanomateriais podem causar efeitos indesejáveis, caso sejam liberados de forma descontrolada, pois têm grande capacidade de se difundir e de se acumular no solo, nos corpos hídricos, na atmosfera e em células vivas. Esses fenômenos são dinâmicos e difíceis de serem controlados, podendo resultar na concentração de toxicantes no ambiente e seu acúmulo na cadeia alimentar, na catálise de processos químicos nocivos ao ambiente e, ainda, na adsorção de biomoléculas com potencial interferência em processos biológicos importantes⁷⁶. O maior problema é que, concretamente, ainda se sabe muito pouco sobre esses efeitos negativos e sua associação ao uso de nanopartículas e de nanotecnologias para aplicações comerciais e industriais.

Todavia, não se deve encarar esses riscos potenciais como um entrave tecnológico, mas sim como um desafio a ser enfrentado. Particularmente em relação à descontaminação de águas residuais de origem industrial, os nanoadsorventes magnéticos mostram-se como uma alternativa de grande potencial de utilização em sistemas alternativos de tratamento local. A alta capacidade de adsorção, o baixo custo de produção e a facilidade de separação e de regeneração tornam esses nanomateriais tecnologicamente e economicamente vantajosos. Somando-se a isso, sua utilização dentro dos limites das fábricas e indústrias, como processo de tratamento secundário de efluentes, diminui drasticamente a possibilidade de dano ambiental.

As nanotecnologias de remediação ambiental não podem ser simplesmente tratadas como tecnologias de risco. Duas das principais armas para contrapor esse discurso são a proposição de políticas de regulação e a regulamentação das nanotecnologias, tema que já se encontra em nível bastante avançado no exterior. A União Europeia, por exemplo, concluiu recentemente o NanoReg, projeto que estabelece normas e recomendações voltadas para utilização dos nanomateriais manufaturados⁷⁷. Nessa pauta, o Brasil deu um passo importante em 2020, com a aprovação do Marco Regulatório da Nanotecnologia e Materiais Avançados, na Comissão de Constituição e Justiça. Entre os principais avanços propostos pela nova legislação, estão a possibilidade de maior apoio de empresas brasileiras que oferecem serviços e produtos com insumos nanotecnológicos e o incentivo à produtividade e à competição do mercado das nanotecnologias no cenário internacional. Finalmente, além de um Marco Regulatório, o país precisa de uma política nacional voltada às nanotecnologias, que permita não somente integrar, mas também fortalecer ações governamentais que promovam seu desenvolvimento.

6. Referências

1. Progress on drinking water, sanitation and hygiene: 2017 update and SDG baselines. Disponível em: <https://www.who.int/water_sanitation_health/publications/jmp-2017/en/>. Acesso em: 10 jul. 2018.
2. BROWN, Kathryn. ENVIRONMENTAL DATA: Water scarcity: Forecasting the future with spotty data. **Science**, [s. l.], v. 297, n. 5583, p. 926–927, ago. 2002.
3. MIZYED, Numan R. Challenges to treated wastewater reuse in arid and semi-arid areas. **Environmental Science & Policy**, [s.l.], v. 25, p. 186–195, jan. 2013.
4. AMIN, Muhammad Tahir; ALAZBA, Abdulrehman Ali; MANZOOR, Umair. A review of removal of pollutants from water/wastewater using different types of nanomaterials. **Advances in Materials Science and Engineering**, [s.l.], v. 2014, p. 1–24, 2014.
5. YUNUS, Ian Sofian et al. Nanotechnologies in water and air pollution treatment. **Environmental Technology Reviews**, [s.l.], v. 1, n. 1, p. 136–148, nov. 2012.
6. QU, Xiaolei; ALVAREZ, Pedro José J.; LI, Qilin. Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment. **Water Research**, [s.l.], v. 47, n. 12, p. 3931–3946, ago. 2013.
7. CORTALEZZI, María M et al. Ceramic Membranes Derived from Ferroxane Nanoparticles: A New Route for the Fabrication of Iron Oxide Ultrafiltration Membranes. **Journal of Membrane Science**, [s.l.], v. 227, n. 1–2, p. 207–217, dez. 2003.
8. LI, Jing-Feng et al. Effect of TiO₂ nanoparticles on the surface morphology and performance of microporous pes membrane. **Applied Surface Science**, [s.l.], v. 255, n. 9, p. 4725–4732, fev. 2009.
9. LIND, Mary Laura et al. Tailoring the structure of thin film nanocomposite membranes to achieve seawater RO membrane performance. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 44, n. 21, p. 8230–8235, nov. 2010.

10. CHAE, So-Ryong et al. Effects of fullerene nanoparticles on escherichia coli K12 respiratory activity in aqueous suspension and potential use for membrane biofouling control. **Journal of Membrane Science**, [s.l.], v. 329, n. 1–2, p. 68–74, 5 mar. 2009.
11. JAIN, Prashant; PRADEEP, Thalappil. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. **Bio-technology and Bioengineering**, [s.l.], v. 90, n. 1, p. 59–63, 5 abr. 2005.
12. SHEPHARD, Gordon Seymour. et al. Degradation of microcystin toxins in a falling film photocatalytic reactor with immobilized titanium dioxide catalyst. **Water Research**, [s.l.], v. 36, n. 1, p. 140–146, jan. 2002.
13. LI, Qilin et al. Antimicrobial nanomaterials for water disinfection and microbial control: potential applications and implications. **Water Research**, [s.l.], v. 42, n. 18, p. 4591–4602, nov. 2008.
14. SAPKAL, Ramchandra T. et al. Photoelectrocatalytic decolorization and degradation of textile effluent using ZnO thin films. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, [s.l.], v. 114, p. 102–107, set. 2012.
15. CHANG, Jih-Hsing; YANG, Tsong-Jen; TUNG, Cheng-Hung. Performance of nano- and nonnano-catalytic electrodes for decontaminating municipal wastewater. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 163, n. 1, p. 152–157, abr. 2009.
16. FU, Fenglian; DIONYSIOU, Dionysios D.; LIU, Hong. The use of zero-valent iron for groundwater remediation and wastewater treatment: A review. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 267, p. 194–205, fev. 2014.
17. TRATNYEK, Paul G.; JOHNSON, Richard L. Nanotechnologies for environmental cleanup. **Nano Today**, [s.l.], v. 1, n. 2, p. 44–48, maio 2006.
18. DAWOOD, Sara; SEN, Tushar. Review on dye removal from its aqueous solution into alternative cost effective and non-conventional adsorbents. **Journal of Chemical and Process Engineering**, [s.l.], v. 1, n. 104, p. 1-11, nov. 2014.

19. WORCH, Eckhard. **Adsorption technology in water treatment**. Berlin ; Boston: De Gruyter, 2012.
20. AL-ANBER, Mohammed; AL-ANBER, Zaid A. Utilization of natural zeolite as ion-exchange and sorbent material in the removal of iron. **Desalination**, [s.l.], v. 225, n. 1–3, p. 70–81, maio 2008.
21. LANGMUIR, Irving. The constitution and fundamental properties of solids and liquids. Part I. Solids. **Journal of the American chemical society**, [s.l.], v. 38, n. 11, p. 2221-2295, nov. 1916.
22. FREUNDLICH, Max Finlay Freundlich. Over the adsorption in solution. **The Journal of Physical Chemistry**, [s.l.], v. 57, p. 385–471, 1906.
23. BRDAR, Mirjana et al. comparison of two and three parameters adsorption isotherm for cr(vi) onto kraft lignin. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 183, p. 108–111, fev. 2012.
24. DANG SON, Bui Hai et al. A study on astrazon black AFDL dye adsorption onto vietnamese diatomite. **Journal of Chemistry**, [s.l.], v. 2016, p. 1–11, 2016.
25. TIWARI, Dharmendra Kumar.; BEHARI, J.; SEN, Prasenjit. Application of nanoparticles in waste water treatment. **World Applied Sciences Journal**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 417–433, jan. 2008.
26. SAVAGE, Nora; DIALLO, Mamadou S. Nanomaterials and water purification: opportunities and challenges. **Journal of Nanoparticle research**, [s.l.], v. 7, n. 4-5, p. 331-342, out. 2005.
27. PAN, Bo; XING, Baoshan. Adsorption mechanisms of organic chemicals on carbon nanotubes. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 42, n. 24, p. 9005-9013, dez. 2008.
28. YANG, Kun; XING, Baoshan. Adsorption of organic compounds by carbon nanomaterials in aqueous phase: Polanyi theory and its application. **Chemical Reviews**, [s.l.], v. 110, n. 10, p. 5989–6008, 13 out. 2010.

29. JI, Liangliang et al. Mechanisms for strong adsorption of tetracycline to carbon nanotubes: a comparative study using activated carbon and graphite as adsorbents. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 43, n. 7, p. 2322–2327, abr. 2009.
30. CHEN, Wei; DUAN, Lin; ZHU, Dongqiang. Adsorption of polar and nonpolar organic chemicals to carbon nanotubes. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 41, n. 24, p. 8295–8300, dez. 2007.
31. YANG, Kun et al. Aqueous adsorption of aniline, phenol, and their substitutes by multi-walled carbon nanotubes. **Environmental Science & Technology**, [s. l.], v. 42, n. 21, p. 7931–7936, 2008.
32. MORENO, Natàlia et al. Utilization of zeolites synthesized from coal fly ash for the purification of acid mine waters. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 35, n. 17, p. 3526–3534, set. 2001.
33. IRANNAJAD, Mehdi; KAMRAN HAGHIGHI, Hossein; MOHAMMAD-JAFARI, Alireza. Heavy metals adsorption by nanozeolites: effect of sodium hexametaphosphate. **Environmental Earth Sciences**, [s.l.], v. 75, n. 13, p. 1058 jul. 2016.
34. NICHOLS, William T. et al. Zeolite LTA Nanoparticles prepared by laser-induced fracture of zeolite microcrystals. **The Journal of Physical Chemistry B**, [s.l.], v. 110, n. 1, p. 83–89, jan. 2006.
35. LEE, Keun-Young et al. Novel application of nanozeolite for radioactive cesium removal from high-salt wastewater. **Water Research**, [s.l.], v. 95, p. 134–141, maio 2016.
36. TASHAUOEI, Hamid Reza et al. Removal of cadmium and humic acid from aqueous solutions using surface modified nanozeolite A. **International Journal of Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 7, n. 3, p. 497–508, jun. 2010.
37. CUNICO, Patricia; KUMAR, Anu; FUNGARO, Denise Alves. Adsorption of dyes from simulated textile wastewater onto modified nanozeolite from coal fly ash. **Journal of Nanoscience and Nanoengineering**, [s.l.], v. 1, n. 3, p. 148-161, ago. 2015.

38. RAD, Leila Roshanfekar; IRANI, Mohammad; BARZEGAR, Roya. Adsorptive Removal of Acetaminophen and Diclofenac Using NaX Nanozeolites Synthesized by Microwave Method. **Korean Journal of Chemical Engineering**, [s.l.], v. 32, n. 8, p. 1606–1612, ago. 2015.
39. FRÉCHET, Jean M. J.; TOMALIA, Donald A. (Org.). **Dendrimers and other dendritic polymers**. Chichester ; New York: Wiley, 2001.
40. ÇAGIN, Tahir et al. Molecular modelling of dendrimers for nanoscale applications. **Nanotechnology**, [s.l.], v. 11, n. 2, p. 77–84, 1 jun. 2000.
41. NIU, Yanhui; CROOKS, Richard M. Dendrimer-encapsulated metal nanoparticles and their applications to catalysis. **Comptes Rendus Chimie**, [s.l.], v. 6, n. 8-10, p. 1049-1059, ago. 2003.
42. SADEGHI-KIAKHANI, Mousa; ARAMI, Mokhtar; GHARANJIG, Kamaladin. Dye removal from colored-textile wastewater using chitosan-PPI dendrimer hybrid as a biopolymer: Optimization, kinetic, and isotherm studies. **Journal of Applied Polymer Science**, [s.l.], v. 127, n. 4, p. 2607-2619, fev. 2013.
43. IANNAZZO, Daniela et al. Removal of heavy metal ions from wastewaters using dendrimer-functionalized multi-walled carbon nanotubes. **Environmental Science and Pollution Research**, [s.l.], v. 24, n. 17, p. 14735-14747, jun. 2017.
44. GEHRKE, Ilka; GEISER, Andreas; SOMBORN-SCHULZ, Annette. Innovations in Nanotechnology for Water Treatment. **Nanotechnology, Science and Applications**, [s.l.], v. 8, p. 1–17, jan. 2015.
45. TAN, Kok Bing et al. Adsorption of dyes by nanomaterials: Recent developments and adsorption mechanisms. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 150, p. 229–242, ago. 2015.
46. REDDY, D. Harikishore Kumar; LEE, Seung-Mok. Application of magnetic chitosan composites for the removal of toxic metal and dyes from aqueous solutions. **Advances in Colloid and Interface Science**, [s.l.], v. 201, p. 68-93, dez. 2013.

47. HU, Jing; LO, Irene MC; CHEN, Guohua. Comparative study of various magnetic nanoparticles for Cr (VI) removal. **Separation and Purification Technology**, [s.l.], v. 56, n. 3, p. 249-256, set. 2007.
48. CAMPOS, Alex Fabiano Cortez et al. Using speciation diagrams to improve synthesis of magnetic nanosorbents for environmental applications. **Bulletin of Materials Science**, [s.l.], v. 34, n. 7, p. 1357-1361, dez. 2011.
49. JIANG, Wenjun et al. Chromium (VI) removal by maghemite nanoparticles. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 222, p. 527-533, abr. 2013.
50. CAMPOS, Alex Fabiano Cortez et al. Core-Shell bimagnetic nanoadsorbents for hexavalent chromium removal from aqueous solutions. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 362, p. 82–91, jan. 2019.
51. HASANY, Syed Farhan et al. Systematic review of the preparation techniques of iron oxide magnetic nanoparticles. **Nanoscience and Nanotechnology**, [s.l.], v. 2, n. 6, p. 148-158, jan. 2012.
52. CAMPOS, Alex Fabiano Cortez et al. Influence of the Spatial Confinement at Nanoscale on the Structural Surface Charging in Magnetic Nanocolloids. **The European Physical Journal E**, [s.l.], v. 36, n. 4, abr. 2013.
53. CHOWDHURY, Saidur Rahman; YANFUL, Ernest K. Arsenic and chromium removal by mixed magnetite–maghemite nanoparticles and the effect of phosphate on removal. **Journal of Environmental Management**, [s.l.], v. 91, n. 11, p. 2238-2247, nov. 2010.
54. AFKHAMI, Abbas; NOROOZ-ASL, Rasoul. Removal, preconcentration and determination of Mo (VI) from water and wastewater samples using maghemite nanoparticles. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, [s.l.], v. 346, n. 1-3, p. 52-57, ago. 2009.
55. ZHANG, Yakun et al. Adsorption of Pb (II) and Hg (II) from aqueous solution using magnetic CoFe_2O_4 -reduced graphene oxide. **Journal of Molecular Liquids**, [s.l.], v. 191, p. 177-182, mar. 2014.

56. KUMAR, Suresh et al. Graphene oxide– MnFe_2O_4 magnetic nano-hybrids for efficient removal of lead and arsenic from water. **ACS Applied Materials & Interfaces**, [s.l.], v. 6, n. 20, p. 17426–17436, 22 out. 2014.
57. BAHGAT, Mohamed et al. Adsorption of methyl green dye onto multi-walled carbon nanotubes decorated with Ni nanoferrite. **Applied Nanoscience**, [s.l.], v. 3, n. 3, p. 251-261, jun. 2013.
58. VILELA, Diana et al. Graphene-Based microbots for toxic heavy metal removal and recovery from water. **Nano Letters**, [s.l.], v. 16, n. 4, p. 2860–2866, 13 abr. 2016.
59. XIAO, Yanzhen et al. Synthesis and adsorption behavior of chitosan-coated MnFe_2O_4 nanoparticles for trace heavy metal ions removal. **Applied Surface Science**, [s.l.], v. 285, p. 498-504, nov. 2013.
60. KAUR, Ranjeet et al. Synthesis and surface engineering of magnetic nanoparticles for environmental cleanup and pesticide residue analysis: A review: Sample Preparation. **Journal of Separation Science**, [s.l.], v. 37, n. 14, p. 1805–1825, jul. 2014.
61. ZHAO, Xiaoli et al. Cetyltrimethylammonium bromide-coated magnetic nanoparticles for the preconcentration of phenolic compounds from environmental water samples. **Environmental Science & Technology**, [s.l.], v. 42, n. 4, p. 1201-1206, fev. 2008.
62. Wang, Hao et al. Cetyltrimethylammonium bromide-coated Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for analysis of 15 trace polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic environments by ultraperformance, liquid chromatography with fluorescence detection. **Analytical chemistry**, [s.l.], v. 87, n. 15, p. 7667-7675, jul. 2015.
63. RODOVALHO, Fernanda L. et al. Elaboration of magneto-thermally recyclable nanosorbents for remote removal of toluene in contaminated water using magnetic hyperthermia. **Chemical Engineering Journal**, [s.l.], v. 302, p. 725-732, out. 2016.

64. DALALI, Nasser et al. Magnetic removal of acidic dyes from waste waters using surfactant-coated magnetite nanoparticles: optimization of process by Taguchi method. In: **Proceedings of International Conference on Environmental and Agriculture Engineering IPCBEE**. 2011. p. 89-94.
65. MAHMOODI, Niyaz Mohammad; BANIJAMALI, Masoomeh; NO-ROOZI, Babak. Surface modification and ternary system dye removal ability of manganese ferrite nanoparticle. **Fibers and Polymers**, [s.l.], v. 15, n. 8, p. 1616–1626, ago. 2014.
66. CAMPOS, Alex Fabiano Cortez et al. Removal of direct yellow 12 from water using CTAB-coated core-shell bimagnetic nanoadsorbents. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 7, n. 2, p. 103031, 2019.
67. HUANG, Yuxiong; KELLER, Arturo A. EDTA functionalized magnetic nanoparticle sorbents for cadmium and lead contaminated water treatment. **Water Research**, [s.l.], v. 80, p. 159–168, set. 2015.
68. GUO, H. et al. Application of iron oxide based nanomaterials (NMs) in magnetic assisted chemical separation (MACS) processes for water/wastewater treatment. **Advanced Materials Research**, [s.l.], v. 610–613, p. 1242–1251, dez. 2012.
69. CHOI, Kyong-Hoon et al. Water-Soluble magnetic nanoparticles functionalized with photosensitizer for photocatalytic application. **The Journal of Physical Chemistry C**, [s.l.], v. 115, n. 8, p. 3212–3219, 3 mar. 2011.
70. AMBASHTA, Ritu D.; SILLANPÄÄ, Mika. Water purification using magnetic assistance: a review. **Journal of Hazardous Materials**, [s.l.], v. 180, n. 1-3, p. 38-49, ago. 2010.
71. IWASHITA, Yoshihisa et al. Strong variable permanent multipole magnets. **IEEE Transactions on Applied Superconductivity**, [s.l.], v. 18, n. 2, p. 957–960, jun. 2008.
72. LEONG, Sim Siong; YEAP, Swee Pin; LIM, JitKang. Working principle and application of magnetic separation for biomedical diagnostic at high- and low-field gradients. **Interface Focus**, [s.l.], v. 6, n. 6, p. 20160048, 6 dez. 2016.

73. GE, Wei et al. Magnetic matrices used in high gradient magnetic separation (HGMS): A review. **Results in Physics**, [s.l.], v. 7, p. 4278–4286, out. 2017.
74. HU, Jing; CHEN, Guohua; LO, Irene M.C. Removal and recovery of Cr(VI) from wastewater by maghemite nanoparticles. **Water Research**, [s.l.], v. 39, n. 18, p. 4528–4536, nov. 2005.
75. SIVASHANKAR, R. et al. Magnetic composite an environmental super adsorbent for dye sequestration—A review. **Environmental Nanotechnology, Monitoring & Management**, [s.l.], v. 1, p. 36-49, nov. 2014.
76. QUINA, Frank Herbert. Nanotecnologia e o meio ambiente: Perspectivas e riscos. **Química Nova**, [s.l.], v. 27, n. 6, p. 1028–1029, dez. 2004.
77. The NANoREG project – A common European approach to the regulatory testing of manufactured nanomaterials. Disponível em: <<http://www.nanoreg.eu/>>. Acesso em: 15 jul. 2018.

CONCLUSÃO

Este livro traz informações sobre as várias facetas do estado da arte da Nanociência e da Nanotecnologia nos campos de síntese e caracterização de nanoestruturas e suas aplicações nas áreas de saúde e meio ambiente.

Neste volume, foram reunidas informações evidenciando a ampla gama de materiais que podem ser utilizados na produção de plataformas nanoestruturadas, como ouro, lipídeos, metais e até mesmo extratos de plantas/fungos e micro-organismos – cada tipo de plataforma apresentando propriedades físicas, químicas e biológicas únicas. Fundamentos e princípios da utilização de ferramentas de caracterização de nanoestruturas, como a microscopia eletrônica de transmissão e de varredura, também foram explorados. Adicionalmente, os textos evidenciaram a versatilidade das nanoestruturas elencadas, destacando exemplos de como modificações de dimensões, carga e composição das plataformas nanoestruturadas podem otimizar sua estabilidade, resposta a campos magnéticos e associações com micro-organismos, células/tecidos e poluentes-alvo.

No campo da saúde, os capítulos exploraram como o uso de nanoestruturas abre novas perspectivas para o tratamento e o diagnóstico de diversas patologias. Foram apresentadas abordagens nanotecnológicas para prevenção, diagnóstico e tratamento de câncer; com ênfase nas formas de entrega das nanoestruturas ao sítio tumoral, mecanismos de internalização e destino intracelular de plataformas nanoestruturadas. Ainda, um capítulo particular foi dedicado para dissertar sobre o potencial, perspectivas e desafios da hipertermia magnética como estratégia inovadora para o tratamento do câncer. Destaques no uso de nanoestruturas para tratamentos antivirais visando à diminuição de custo, toxicidade reduzida, menor chance de resistência viral e até mesmo aplicações como nanobiossensores para fins diagnósticos foram explorados. Interações de nanoestruturas com a pele, com ênfase para aplicações terapêutica/diagnóstica de inflamações e infecções cutâneas e outras patologias da pele, foram exploradas. Um capítulo

do livro foi dedicado para discussão da aplicação de nanoestruturas nas áreas de regeneração e cicatrização tecidual. O capítulo sobre aplicações oftalmológicas da nanotecnologia trouxe destaque para os desafios de tratamentos convencionais para doenças oftalmológicas e como o uso de nanoestruturas pode superar essas limitações e trazer mais eficácia terapêutica nesse contexto.

O capítulo final do livro apresenta as vantagens e limitações do uso de nanoestruturas para a descontaminação de corpos d'água. Por fim, uma abordagem especial foi dada aos nanoadsorventes magnéticos, como nanomateriais multifuncionais de grande potencial para remediação de águas residuais de origem industrial.

A coletânea de capítulos apresentados é uma valiosa fonte de informações e inspirações, que podem ser utilizadas para diversos propósitos, incluindo, mas não limitados a, fins didáticos na formação de estudantes de graduação e recursos humanos, preparação de cursos/ eventos para gestores e profissionais que trabalham na área e divulgação científica para o público leigo. No entanto, o tema Nanociência e Nanotecnologia é vasto e dinâmico, passando por atualizações que variam exponencialmente. Não sendo possível, portanto, explorá-lo em sua totalidade em um único livro publicado em determinado ponto da história. Por isso, na linha do tempo, este é o primeiro volume da série que pretende continuar explorando, divulgando, acompanhando novos avanços e evidenciando o destaque da pesquisa brasileira e internacional sobre esse tema inovador que estará cada vez mais presente em nossa sociedade.

SOBRE OS ORGANIZADORES



Graziella Anselmo Joanitti

Bióloga pela UnB, mestre e doutora em Biologia Animal, com ênfase em biologia celular e nanotecnologia, pela UnB; doutorado sanduíche (Northeastern University (EUA)); Profa. Assistente na UnB; credenciada no PPG em Nanociência e Nanobiotecnologia e no PPG em Ciências e Tecnologias em Saúde da UnB. É uma das pesquisadoras integrantes do INCT em Nanobiotecnologia. Atua na área de desenvolvimento de nanoestruturas baseadas em compostos naturais para aplicações biomédicas e nutracêuticas.



Paulo César de Morais

Especialista em nanomateriais; Professor Titular (UnB); Professor Emérito (UnB); Professor Visitante (HUST e AHU – China); Professor (UCB); Pesquisador CNPq-1A; Membro Sênior IEEE; Parecerista (40+); Membro de corpo editorial (7); 450+ trabalhos no WoS; 130+ palestras (20+ países); Orientador de 70+ estudantes; Coordenador de projetos nacionais (10+ instituições) e internacionais (15+ países). Bacharel em Química e Física (UnB); Mestre em Física (UnB); Doutor em Física (UFMG); Pós-doutorado (Bellcore – USA).



Ricardo Bentes de Azevedo

Biomédico pela UFPA, mestre e doutor em Biologia Celular e Tecidual pela USP-SP; pós-doutor pelo NIH (EUA). Prof. titular livre em Nanobiotecnologia pelo IB-UnB; Prof. Honorário pela Universidade de Jinan (China); bolsista de produtividade 1A do CNPq e Coordenador do INCT em Nanobiotecnologia. Possui mais de 200 artigos publicados em diferentes periódicos científicos, incluindo Nature, Biomaterials, Nanoscale, entre outros. Atua na área de Nanotecnologia aplicada a saúde humana e animal.

NANOTECNOLOGIA: CONSIDERAÇÕES EM MATERIAIS, SAÚDE E MEIO AMBIENTE

Qualquer leitor, com o mínimo de interesse em Tecnologia, não pode ficar alheio à Nanociência e Nanotecnologia (N&N), que representam importantes fronteiras do conhecimento científico e tecnológico. O traço da N&N é a transversalidade de sua atuação e o impacto que protagoniza nos dias de hoje, em franco crescimento. Este livro foi concebido e produzido para fornecer ao leitor informações básicas e aplicadas sobre a N&N. O livro destaca duas vertentes importantes da N&N: síntese e caracterização de nanomateriais e aplicações em saúde e meio ambiente. O texto não pretende cobrir todo o universo da N&N, porém inclui tópicos relevantes, organizados dos fundamentos para as aplicações, oferecendo ao leitor um marco introdutório, que por iniciativas individuais poderá se aprofundar em diferentes direções da N&N. O texto reflete parte da experiência acumulada pela rede de N&N, organizada a partir do trabalho conjunto de diferentes laboratórios e unidades acadêmicas pertencentes à Universidade de Brasília (UnB), com foco no ensino de pós-graduação, pesquisa, desenvolvimento e inovação. Esta rede foi organizada a partir do final da década de 1990, e nos anos subsequentes estendeu-se muito além da UnB, envolvendo cerca de duas dezenas de instituições parceiras no país e no exterior, coletando o saldo de quase um milhar de patentes e artigos publicados em revistas científicas indexadas e cerca de cinco centenas de orientações de alunos de pós-graduação.